

Evaluación de estrategias para la biorremediación de suelos hortícolas bonaerenses impactados con endosulfán y clorpirifos

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias

Sonia M. Cabrera

Licenciada en Ciencias Biológicas - UBA - 2009

Lugar de trabajo: Cátedra de Fertilidad y Fertilizantes – Facultad de Agronomía –
Universidad de Buenos Aires



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Directora de tesis

Marta Susana Zubillaga

Ing. Agrónoma (UBA)

Doctora en Ciencia y Tecnología Ambiental (Universidad de La Coruña)

Co-director

Javier Marcelo Montserrat

Lic. Ciencias Químicas (UBA)

Doctor en Ciencias Químicas (Universidad de Oviedo España)

Consejero de Estudios

Agustina Branzini

Lic. Ciencias Biológicas (UBA)

Doctora Ciencias Agropecuarias (UBA)

JURADO DE TESIS

JURADO

Mirta Luján Menone

Doctora en Ciencias Biológicas

Licenciada en Ciencias Biológicas

JURADO

Vanesa Analía Silvani

Doctora en Ciencias Biológicas (UBA)

Licenciada en Ciencias Biológicas (UBA)

JURADO

Susana Beatriz Hang

Ing. Agrónoma (UNC)

Doctora en Ciencias Agropecuarias (UNC)

Fecha de defensa de la tesis: 1 de Octubre de 2020

A los pueblos fumigados

Agradecimientos:

A mi comité, a Marta Zubillaga por darme la oportunidad, por creer en mi y en el proyecto y por su acompañamiento durante estos años. A Javier Montserrat por la confianza y abrirme las puertas de su laboratorio, por su dedicación en transmitir su conocimiento, por su paciencia y optimismo. Ambos me enseñaron a valorar y defender mi trabajo. A Agustina Branzini por su asesoramiento y apoyo.

A los docentes y becarios de la Catedra de Fertilidad, por la buena disposición para colaborar, pensar juntos, resolver en el quehacer diario científico. Gracias a Flavio, Pablo, Patricia, Haydeé, Raúl, Helena, Daniela y Ana Muzlera. En especial a Claudio Andocilla por acompañarme al muestreo en las huertas de La Plata; a Ivana López por su colaboración en el ensayo de invernáculo, y a Gómez por los mates, las charlas, los mil favores, por ser el mejor compañero que un becari@ puede tener.

A los docentes y becarios del Instituto de Ciencias de la Universidad Nacional Gral. Sarmiento, me han abierto las puertas del laboratorio (y las gavetas de solventes). Siempre que tuve dudas – y fueron muchas- me ayudaron con increíble buena disposición. Henry, Erica, Pedro, Guido, Marina, Giselle, Gretel y en especial Giselle B. Aprendí mucho de ustedes.

Agradezco al Dr. Manuel Tejada (y al Grupo de Investigación Edafología Ambiental, Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola), de la Universidad de Sevilla, por su tiempo y por dirigirme en mi estancia durante la cual evaluamos la efectividad del okara como bioestimulante.

A la Dra. Irmene Ortiz López por aceptarme y dirigir el trabajo de aislamiento de cepas bacterianas en la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-C) en México, en el que destaco su compromiso para lograr los objetivos propuestos, como así también su calidez y excelencia académica. Al Dr. Sergio Hernández, por capacitarme en técnicas microbiológicas y por su amistad durante la estancia.

A Sebastián Munilla por su asesoramiento en análisis estadístico. A Marcela Harris y la Catedra de Horticultura por su contacto con productores de La Plata.

A mi familia, amig@s y amores por siempre darme apoyo, poner el oído, darme ánimos y reírnos. A Bren por ser mi melliza de tesis, gracias por tu empatía y tener las palabras justas. No me imagino como sería sin ustedes.

Agradezco a Yamila porque gracias a su terapia esta tesis fue mucho más que un trabajo académico, fue un trabajo personal profundo. Le recomiendo a todo tesista tener acompañamiento. Con lo cual, aprovecho este párrafo para agradecerme a mí.

Gracias a la educación pública y a la Universidad de Buenos Aires por financiar este proyecto y por permitirme vivir de investigar durante el desarrollo de la tesis.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

Artículos en revistas internacionales con referato

Use of okara in the bioremediation of chlorpyrifos in soil. Effects on soil biochemical properties. Tejada M., Parrado J., Gomez I., Franco-Andreu L., Orts A., Cabrera S. 2017. Applied Soil Ecology 121: 172-176

INDICE GENERAL

| | |
|--|------|
| Índice de cuadros..... | XII |
| Índice de figuras..... | XIII |
| Índice de imágenes..... | XV |
| Resumen..... | XIX |
| Capítulo 1. Introducción general..... | 1 |
| 1.1. Objetivos | 12 |
| 1.2. Hipótesis General | 13 |
| 1.3. Diseño de la tesis..... | 14 |
| Capítulo 2. Detección de plaguicidas persistentes en suelo de establecimientos productivos del cinturón hortícola platense | 15 |
| 2.1. Introducción | 16 |
| 2.1.1 Objetivo..... | 20 |
| 2.1.2 Hipótesis..... | 21 |
| 2.2. Materiales y Métodos..... | 21 |
| 2.2.1 Sitios de muestreo | 21 |
| 2.2.2 Muestreo y acondicionamiento de suelo..... | 22 |
| 2.2.3 Análisis de plaguicidas en suelo | 23 |
| 2.2.3.1 Extracción de insecticidas del suelo..... | 24 |
| 2.2.3.2 Concentración del extracto..... | 24 |
| 2.2.3.3 Detección..... | 25 |
| 2.3. Resultados | 27 |
| 2.4. Discusión..... | 30 |
| 2.5 Conclusiones | 31 |
| Capítulo 3. Atenuación natural de clorpirifos y endosulfán en suelos con diferente historia de uso del cinturón hortícola de La Plata..... | 32 |
| 3.1. Introducción | 33 |
| 3.1.1 Objetivo general | 38 |
| 3.1.2 Objetivos específicos | 38 |
| 3.1.2 Hipótesis..... | 39 |
| PARTE A | 39 |
| 3.2. Materiales y Métodos..... | 39 |
| 3.2.1. Suelo..... | 39 |
| 3.2.1.1. Muestreo y acondicionamiento | 42 |

| | |
|--|----|
| 3.2.2. Diseño del experimento..... | 42 |
| 3.2.3 Análisis de plaguicidas..... | 45 |
| 3.2.4 Análisis fisicoquímicos del suelo..... | 45 |
| 3.2.4.1 Contenido de humedad y capacidad de campo (CC) | 46 |
| 3.2.4.2 Textura | 47 |
| 3.2.5 Variables bioquímicas | 48 |
| 3.2.5.1 Respiración microbiana..... | 48 |
| 3.2.5.2 Carbono de la biomasa microbiana | 50 |
| 3.2.5.3 Actividad Enzimática deshidrogenasa | 51 |
| 3.2.6 Análisis estadístico..... | 52 |
| 3.3 Resultados | 53 |
| 3.3.1 Suelo..... | 53 |
| 3.3.2 Plaguicidas | 54 |
| 3.3.2.1 Clorpirifos | 56 |
| 3.3.2.2 Endosulfán | 57 |
| 3.3.2.3 Endosulfán sulfato..... | 60 |
| 3.3.3 Variables bioquímicas | 62 |
| 3.4 Discusión..... | 66 |
| 3.5 Conclusiones | 71 |
| PARTE B | 71 |
| 3.5 Materiales y Métodos..... | 71 |
| 1.5.1 Suelo | 71 |
| 1.5.2 Plaguicida | 71 |
| 1.5.3 Aislamiento..... | 72 |
| 3.5.4 Pruebas de inhibición en placa..... | 73 |
| 3.5.5 Ensayo de degradación..... | 74 |
| 3.5.6 Actividad metabólica | 75 |
| 3.5.7 Análisis de plaguicidas..... | 76 |
| 3.5.7.1 Extracción líquido-líquido | 76 |
| 3.5.7.2 Detección y cuantificación..... | 77 |
| 3.6 Resultados | 78 |
| 3.6.1 Aislamiento y purificación..... | 78 |
| 3.6.2 Prueba de Inhibición | 82 |
| 3.6.3 Ensayo de Degradación..... | 83 |

| | |
|--|-----|
| 3.6.4 Actividad metabólica | 83 |
| 3.7 Discusión y conclusiones | 85 |
| Capítulo 4. Evaluación de enmiendas orgánicas para la biorremediación de suelo impactado con clorpirifos y endosulfán..... | 88 |
| 4.1 Introducción | 89 |
| 4.1.1 Objetivo general | 92 |
| 4.1.2 Objetivos específicos | 92 |
| PARTE A | 93 |
| 4.2 Materiales y Métodos..... | 93 |
| 4.2.1 Suelo..... | 93 |
| 4.2.2 Plaguicidas | 94 |
| 4.2.3 Bioestimulantes | 94 |
| 4.2.4 Diseño del experimento..... | 98 |
| 4.2.5 Análisis de los bioestimulantes (BS)..... | 99 |
| 4.2.6 Análisis de los plaguicidas | 100 |
| 4.2.7 Actividad enzimática deshidrogenasa | 101 |
| 4.2.8 Ensayo de fitotoxicidad..... | 101 |
| 4.2.9 Análisis estadístico..... | 104 |
| 4.3 Resultados | 104 |
| 4.3.1. Características de los bioestimulantes..... | 104 |
| 4.3.2. Plaguicidas | 105 |
| 4.3.2.1 Clorpirifos | 105 |
| 4.3.2.2 Endosulfán | 106 |
| 4.3.3. Actividad enzimática deshidrogenasa (ADH)..... | 109 |
| 4.3.4. Ensayo de fitotoxicidad..... | 110 |
| 4.4 Discusión..... | 113 |
| PARTE B | 117 |
| 4.5 Materiales y Métodos..... | 117 |
| 4.5.1 Suelo..... | 117 |
| 4.5.2 Plaguicida..... | 117 |
| 4.5.3 Bioestimulantes | 118 |
| 4.5.4 Diseño del experimento..... | 120 |
| 4.5.5 Análisis de plaguicidas..... | 122 |
| 4.5.6 Actividad enzimática..... | 122 |
| 4.5.6.1 Actividad Deshidrogenasa | 122 |

| | |
|---|-----|
| 4.5.6.2 Actividad Ureasa..... | 123 |
| 4.5.6.3 Actividad fosfatasa..... | 124 |
| 4.5.6.4 Actividad β -glucosidasa..... | 125 |
| 4.5.7 Análisis estadístico..... | 125 |
| 4.6 Resultados | 125 |
| 4.6.1 Caracterización del bioestimulante | 125 |
| 4.6.2 Evolución del clorpirifos..... | 126 |
| 4.6.3 Propiedades bioquímicas del suelo | 128 |
| 4.7 Discusión..... | 131 |
| 4.8 Conclusiones generales | 132 |
| Capítulo 5. Evaluación de un cultivo energético como potencial especie fitorremediadora de suelo impactado con endosulfán | 134 |
| 5.1 Introducción | 135 |
| 5.1.1 Objetivo..... | 137 |
| 5.1.2 Hipótesis..... | 137 |
| 5.2 Materiales y métodos | 137 |
| 5.2.1 Suelo..... | 137 |
| 5.2.2 Plantas | 138 |
| 5.2.3 Plaguicida..... | 139 |
| 5.2.4 Diseño del experimento..... | 139 |
| 5.2.5 Análisis de plaguicida | 140 |
| 5.2.6 Variables bioquímicas..... | 140 |
| 5.2.6.1 Respiración microbiana del suelo (RB) | 140 |
| 5.2.6.2 Actividad deshidrogenasa (ADH)..... | 141 |
| 5.2.7 Análisis estadístico..... | 141 |
| 5.3 Resultados | 141 |
| 5.3.1 Planta fitorremediadora..... | 141 |
| 5.3.2 Endosulfán | 143 |
| 5.3.3 Variables bioquímicas..... | 145 |
| 5.3.3.1 Respiración basal | 145 |
| 5.3.3.2 Actividad deshidrogenasa (ADH)..... | 146 |
| 5.3.4 Herbivoría | 147 |
| 5.4 Discusión..... | 149 |
| 5.5 Conclusiones | 151 |
| Capítulo 6. Discusión general y Conclusiones..... | 153 |

| | |
|---|-----|
| 6.1 Síntesis y discusión de los principales resultados de la tesis. | 154 |
| 6.2 Conclusiones principales..... | 159 |
| 6.3 Contribuciones originales de la tesis..... | 161 |
| 6.4 Futuras líneas de trabajo..... | 162 |
| 6.5 Apreciaciones finales | 163 |
| Bibliografía | 163 |
| Material Suplementario | 184 |
| A)Puesta a punto del procedimiento de extracción de clorpirifos y endosulfán de suelo.. | 184 |
| B)Curvas de calibrado del ensayo atenuación natural. | 186 |
| C)Curva de calibrado para la Actividad Enzimatica Deshidrogenasa | 188 |
| D)Medio mineral para aislamiento..... | 188 |
| E)Soluciones para placa de agar | 188 |
| G)Curva de calibrado de endosulfán (suma de isómeros) en suelo y en bioestimulante | 190 |
| H)Preparación de reactivos para actividades enzimáticas | 190 |
| I)Curva de calibrado del ensayo de fitorremediación | 191 |
| J) Parametros de validación | 192 |
| j.1) Rango de respuesta lineal | 192 |
| j.2) Recuperación | 192 |
| j.3) Precisión | 192 |
| j.4) Resolución | 193 |
| j.5) Límite de cuantificación (LC) | 193 |

Índice de cuadros

Capítulo 1

| | |
|--|---|
| Cuadro 1.1: Propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas de estudio..... | 8 |
|--|---|

Capítulo 2

| | |
|--|----|
| Cuadro 2.1: Cuadro sintético del esfuerzo de muestreo y su distribución..... | 23 |
| Cuadro 2.2: Condiciones de trabajo del equipo de detección CG-ECD para las muestras de suelo de huerta..... | 26 |
| Cuadro 2.3: Condiciones de trabajo del equipo de detección CG-MS para las muestras de suelo de huerta. ES: endosulfán sulfato. TCP: 3,5,6-tricloro-2-piridinol..... | 27 |
| Cuadro 2.4: Resultados de detección de insecticidas en las huertas relevadas..... | 28 |

Capítulo 3

| | |
|--|----|
| Cuadro 3.1: Plaguicidas aplicados en el ensayo y sus dosis | 44 |
| Cuadro 3.2: Características fisicoquímicas del suelo empleado en el experimento..... | 54 |
| Cuadro 3.3: Datos cinéticos de clorpirifos en tres suelos experimentales, $t_{1/2}$ es la vida media expresada en días con su intervalo de confianza (IC95%), y k la constante de degradación..... | 57 |
| Cuadro 3.4: Datos cinéticos de endosulfán total y sus isómeros en tres suelos experimentales, $t_{1/2}$ es la vida media expresada en días con su intervalo de confianza (IC95%), y k la constante de degradación. Dentro de una fila, y para el mismo isómero, vidas medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). SH: Suelo hortícola convencional, SA: suelo hortícola de producción orgánica y SR: suelo de referencia de uso recreativo..... | 58 |
| Cuadro 3.5: Evolución de la respiración basal microbiana (RB), actividad enzimática deshidrogenasa (ADH) y carbono de la biomasa microbiana (CBM). Los valores representan las medias ($n=3$) y el desvío estándar. La columna -1 corresponde al momento previo a la aplicación de los plaguicidas. Dentro de una misma columna, medias con la misma letra(s) no son significativamente distintas (Tukey test, $p < 0,05$). TPF: trifenilformazán; SH: Suelo hortícola convencional, SA: suelo hortícola de producción orgánica y SR: suelo de una reserva con uso recreativo..... | 65 |
| Cuadro 3.6: Resultados de la purificación, identificación morfológica y tinción Gram..... | 78 |
| Cuadro 3.7: Colonias en tinción Gram observadas al microscopio en aumento de 100X.... | 81 |

Capítulo 4

| | |
|---|-----|
| Cuadro 4.1: Composición química (media \pm desv.est., $n = 3$) de los bioestimulantes. En donde no se presenta el desvío estándar es porque se trató de una muestra compuesta. BRF: madera rameal fragmentada, BKS: bokashi, CP: cama de pollo..... | 105 |
| Cuadro 4.2: Datos cinéticos de las curvas de degradación de clorpirifos..... | 106 |

| | |
|---|-----|
| Cuadro 4.3: Datos cinéticos de las curvas de degradación de endosulfán total (sumatoria de isómeros). Los valores representan medias (n=4)..... | 108 |
| Cuadro 4.4: Datos cinéticos de las curvas de degradación de endosulfán discriminado por isómero. Los valores representan medias (n=4). Dentro de cada fila y para un mismo isómero, medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)..... | 108 |
| Cuadro 4.5: Datos de actividad enzimática deshidrogenasa para el T0 y un tiempo medio del ensayo. Los valores representan medias (n=4) \pm desv. est. Dentro de cada columna, medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). C: control; CP: cama de pollo; BKS: bokashi; BRF: madera rameal fragmentada..... | 109 |
| Cuadro 4.6: Porcentajes de germinación de semillas (G), elongación de hipocotilo (E), longitud de radícula (LR), longitud de hipocotilo (LH) e Índice de germinación (IG) de L. sativa tratadas con extractos de diferentes enmiendas. Los datos representan media y error estándar (n = 4)..... | 111 |
| Cuadro 4.7: Composición química y distribución de peso molecular proteico (media \pm desv.est., n = 3) del okara en sus dos estados. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)..... | 126 |
| Cuadro 4.8: Datos cinéticos de las curvas de degradación de clorpirifos. Los valores representan medias (n=4). Vidas medias con una letra distintas son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)..... | 127 |
| Cuadro 4.9: Evolución de la actividad enzimática deshidrogenasa (ADH) y actividad ureasa (media \pm d.st, n = 3) en suelo con adición de okara puro, hidrolizado y/o clorpirifos durante el ensayo. Dentro de cada columna, valores seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). C: suelo; I: insecticida; INTF: 2- <i>p</i> -iodo-3-nitrofenil formazán..... | 129 |
| Cuadro 4.10: Evolución de la actividad β -glucosidasa y fosfatasa (media \pm d.st, n = 3) en suelo con adición de okara puro, hidrolizado y/o clorpirifos durante el ensayo. Dentro de cada columna, valores seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). C: suelo; I: insecticida; PNP: <i>p</i> -nitrofenol..... | 130 |

Capítulo 5

| | |
|---|-----|
| Cuadro 5.1: Datos de actividad enzimática deshidrogenasa para tres tiempos del ensayo. | 147 |
|---|-----|

Índice de figuras

Capítulo 1

| | |
|---|---|
| Fig. 1.1: Rutas de degradación del endosulfán (tomado de Querejeta G. 2015)..... | 4 |
|---|---|

Capítulo 2

| | |
|---|----|
| Fig. 2.1: Superficie de la provincia de Buenos Aires dedicada a la actividad hortícola y florícola | 16 |
| Fig. 2.2: Cromatograma de corriente iónica total (TIC) de una muestra de suelo..... | 28 |

Fig. 2.3: Espectro de masas correspondiente al endosulfán sulfato (19.85 min) obtenido de la biblioteca de espectros de masa del NIST.....29

Capítulo 3

Fig. 3.1: Esquema de las transformaciones de un plaguicida en el ambiente.....34

Fig. 3.2: Cromatograma del punto 0,5 ppm de la curva de calibrado. Ambos picos bien definidos corresponden a los isómeros α y β45

Fig. 3.3: a) Curvas de degradación de clorpirifos. b) Curvas de degradación de endosulfán. Se grafican las medias de 3 observaciones y las barras de desvío estándar (desv.est). SHE: suelo de huerta esterilizado, SH: suelo de huerta.....55

Fig. 3.4: Curvas de degradación de clorpirifos. Se grafican las medias de 3 observaciones \pm desv.est. y la función de ajuste exponencial decreciente para todos los tratamientos. SH: Suelo hortícola convencional; SA: suelo hortícola de producción orgánica; SR: suelo de referencia.....56

Fig. 3.5: Curvas de degradación de endosulfán. Se grafican las medias de 3 observaciones y la función de ajuste exponencial decreciente para todos los tratamientos. SH: Suelo hortícola convencional; SA: suelo hortícola de producción orgánica; SR: suelo de referencia.....58

Fig. 3.6: A) Curva de degradación del isómero α en los tres tipos de suelo y su función de ajuste. B) Curva de degradación para el isómero β . Los puntos graficados representan la media de 3 valores y las barras su desvío estándar.....60

Fig. 3.7: Cromatograma de los iones característicos (m/z 422, 387 y 272) de la muestra de SR a los 120 días post aplicación. El pico más visible con tiempo de retención 19,86 minutos, pertenece a Endosulfán sulfato.....61

Fig. 3.8: Evolución de endosulfán sulfato en los tres suelos.....62

Fig. 3.9: Relación entre actividad deshidrogenasa y a) %COT, b) pH.....64

Fig. 3.10: Esquema de los destinos posibles de un plaguicida en el ambiente. Tomado y traducido de Verma et al. (2014).....67

Fig. 3.11: Evolución del CO₂ emitido por la cepa 1 en presencia (C1) y en ausencia (endógeno) de endosulfán. Las barras representan el desvío estándar. Para C1 (n=3) y para el endógeno (n=2).....84

Fig. 3.12: Evolución del CO₂ emitido por la cepa 2 en presencia (C2) y en ausencia (endógeno) de endosulfán. Las barras representan el desvío estándar. Para C2 (n=3) y para el endógeno (n=2).....85

Capítulo 4

Fig. 4.1: Esquema de pila de Bocashi. Los materiales se agregan en capas y se repite el orden hasta agotarse.....97

Fig. 4.2: Curvas de degradación de clorpirifos en suelo (C) y en suelo con los distintos bioestimulantes: cama de pollo (CP), bokashi (BKS), y madera rameal fragmentada (BRF).

Se grafican las medias de 4 observaciones con su desvío estándar, y la función de ajuste exponencial decreciente para todos los tratamientos.106

Fig. 4.3: Curvas de degradación de endosulfán en suelo (C) y en suelo con los distintos bioestimulantes: cama de pollo (CP), bokashi (BKS), y madera rameal fragmentada (BRF). Se grafican las medias de 4 observaciones con su desvío estándar, y la función de ajuste exponencial decreciente para todos los tratamientos.107

Fig. 4.4: Curvas de degradación de β -endosulfán en suelo (C) y en suelo con los distintos bioestimulantes: cama de pollo (CP), bokashi (BKS), y madera rameal fragmentada (BRF). Se grafican las medias de 4 observaciones con su desvío estándar, y la función de ajuste exponencial decreciente para todos los tratamientos.109

Fig. 4.5: Proceso de hidrólisis enzimática empleada en la obtención de bioestimulante/biofertilizante a partir de okara puro.119

Fig. 4.6: Curvas de degradación de clorpirifos en suelo (C+I), en suelo con okara puro (C+I+Op) y en suelo con okara hidrolizado (C+I+Oh). Se grafican las medias de 3 observaciones con su desvío estándar, y la función de ajuste exponencial decreciente para todos los tratamientos.127

Capítulo 5

Fig. 5.1: Esquema de los procesos de aprovechamiento de la biomasa de *Miscanthus*.136

Fig. 5.2: Rendimiento de $M \times g$ en macetas durante el ensayo. Aclaración: Se incluyeron datos de biomasa hasta los 155 días que el ensayo estuvo en pie, pero no se analizó el suelo en busca de plaguicidas en esa fecha.142

Fig. 5.31: Temperatura media diaria registrada durante el ensayo. La línea roja señala el cambio de estación. Los datos provistos por el Servicio Meteorológico Nacional (SMN) y procesada por la Cátedra de Climatología y Fenología Agrícola de la Facultad de Agronomía (FAUBA).142

Fig. 5.4: Curva de degradación de endosulfán total en macetas con endosulfán (E) y con endosulfán y $M \times g$ (P+E). Se grafican las medias de 4 observaciones con su desvío estándar, y una única función de ajuste exponencial global y decreciente ($R^2=0,82$).144

Fig. 5.5: Cociente de concentración de α y β -endosulfán durante el ensayo.145

Fig. 5.6: Evolución de la respiración basal edáfica del ensayo de fitorremediación en el tiempo. Los tratamientos son sp sE: sin planta sin endosulfán; E: con endosulfán; P+E: planta y endosulfán; P: planta. Cada punto representa la media ($n=4$) y su desv. est.146

Fig. 5.7: Diagrama de dispersión de los datos de P y P+E. Los puntos son datos individuales y la línea solida representa la función de ajuste. ADH: actividad deshidrogenasa, calculada como μg TPF/g h.147

Índice de imágenes

Capítulo 2

Imagen 2.1: Establecimiento hortícola de producción convencional del Partido de La Plata.22

| | |
|--|----|
| Imagen 2.2: Proceso de concentración del extracto en un rotaevaporador..... | 25 |
|--|----|

Capítulo 3

| | |
|---|----|
| Imagen 3.1: a) Establecimiento productivo hortícola de tipo convencional. b) Establecimiento productivo hortícola de tipo orgánico. c) toma de muestras en Parque Pereyra Iraola considerado suelo de referencia de la zona..... | 41 |
| Imagen 3.2: Campana de flujo laminar para la aplicación de plaguicidas del suelo SHE... | 43 |
| Imagen 3.3: a) Suelo en suspensión previo a la medición. b) Medición con hidrómetro.... | 48 |
| Imagen 3.4: Preparación de cámaras para medir respiración basal: 25 g de suelo fresco, trampa álcali NaOH 0,1 M con fenolftaleína..... | 49 |
| Imagen 3.5: Primera siembra del sobrenadante en LB..... | 73 |
| Imagen 3.6: Equipo de cromatografía gaseosa empleado en la detección de CO ₂ | 75 |
| Imagen 3.7: Extracción líquido-líquido en campana de extracción. A la izquierda embudos de decantación con la muestra y una cantidad equivalente de diclorometano. Debajo los embudos con sulfato de sodio. A la derecha el matraz kitasato empleado en la filtración..... | 77 |
| Imagen 3.8: Resultado de la prueba de inhibición. La primera de la izquierda (B1 R1) sufrió una leve inhibición que se identifica como un anillo traslucido alrededor del disco de papel y las otras dos se muestran como ejemplo de crecimiento normal alrededor del disco..... | 83 |

Capítulo 4

| | |
|--|-----|
| Imagen 4.1: Ramas jóvenes de álamo recién podadas..... | 95 |
| Imagen 4.2: Fragmentos de ramas jóvenes..... | 95 |
| Imagen 4.3: Producto final (BRF) recién triturado y listo para usar..... | 96 |
| Imagen 4.4: Cama de pollo empleada en el ensayo..... | 98 |
| Imagen 4.5: BRF luego de la incineración a 550°C. Cuando el material es rico en MO se usa una tapa de aluminio en todo momento para evitar la pérdida de cenizas durante la manipulación..... | 99 |
| Imagen 4.6: Preparación del bioensayo de toxicidad. Se colocan veinte semillas de lechuga en cada caja de Petri..... | 103 |
| Imagen 4.7: Foto del tratamiento suelo + BRF a los 30 días de comenzado el experimento en donde se observa micelio blanco cubriendo la mezcla..... | 110 |
| Imagen 4.8: Punto final del ensayo pasadas 120 horas. A la izquierda, el tratamiento con extracto de cama de pollo y a la derecha el tratamiento control con agua destilada..... | 112 |
| Imagen 4.9: Foto del bioestimulante en sus estados seco (puro) e hidrolizado..... | 121 |

| | |
|---|-----|
| Imagen 4.10: Microcosmos durante la aplicación de okara hidrolizado..... | 121 |
| Imagen 4.11: Microcosmos durante la aplicación de Okara puro y tamizado previa homogenización. | 122 |
| Imagen 4.12: Etapa de filtrado del metanol en la técnica de Treyors modificada por Garcia et al. 1993 de actividad deshidrogenasa. El color rojo se debe al INTF formado después de la incubación de suelo con INT, durante 20 horas en oscuridad..... | 123 |
| Imagen 4.13: a) Extracto de la técnica Kandeler y Gerber previo a la medición de su absorbancia. b) Extracto de reacción para la fosfatasa alcalina y su control sin sustrato. El método colorimétrico para medir p-nitrofenol se basa en el hecho que en solución alcalina este compuesto tiene color amarillo..... | 124 |

Capítulo 5

| | |
|--|-----|
| Imagen 5.1: Selección de rizomas de $M \times g$ previo al ensayo..... | 138 |
| Imagen 5.2: Ensayo de macetas en invernáculo en la Cátedra de fertilidad con $M \times g$ | 140 |
| Imagen 5.3: Rizomas y raíces de <i>Miscanthus x giganteus</i> cosechados a los 110 días de comenzado el ensayo, previo al secado en estufa..... | 143 |
| Imagen 5.4: (Izq) Larvas de <i>L. eufala</i> recién colectadas. (Der) Adulto emergido post incubación..... | 148 |

Siglas y abreviaturas

ADH: Actividad deshidrogenasa

BKS: Bokashi

BRF: madera rameal fragmentada

CC: Capacidad de campo

CG-ECD: Cromatografía gaseosa acoplada a captura de electrones

CG-MS: Cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas

COP: Compuesto orgánico persistente

COT: Carbono orgánico total

CP: Cama de pollo

ES: Endosulfán sulfato

INT: 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio

INTF: Iodonitrotetrazolio formazán

LB: Luria- Bertani

M x g: *Miscanthus x giganteus*

MO: Materia orgánica

Oh: Okara hidrolizado

Op: Okara puro

PDA: Potato dextrose agar

RB: Respiración basal

t_{1/2}: Tiempo de vida media

TCP: 3,5,6-tricloro-2-piridinol

Resumen

Título: Evaluación de estrategias para la biorremediación de suelos hortícolas bonaerenses impactados con endosulfán y clorpirifos

El persistente y excesivo uso de plaguicidas causa una grave contaminación y deterioro del suelo cultivable y del ambiente que lo rodea. En Argentina son cada vez más los estudios que detectan plaguicidas en agua superficial, subterránea, sedimentos, biota acuática y terrestre, por lo que es relevante estudiar su dinámica en suelos y evaluar posibles vías de mitigación para evitar que estos funcionen como fuente difusa de contaminación y para asegurar alimentos de calidad. En la presente tesis, el objetivo fue evaluar estrategias de biorremediación para acelerar la degradación de dos de los insecticidas más utilizados en el país durante una década: un organoclorado, el endosulfán, y un organofosforado, el clorpirifos. Los ensayos fueron mayormente en microcosmos con suelo proveniente del cinturón hortícola platense y aplicando dosis conocidas de los plaguicidas. Se definieron metodologías de extracción de plaguicidas y los análisis se realizaron por CG-ECD. Se estudió la atenuación natural, la bioestimulación y la fitorremediación de dichos compuestos y se obtuvieron curvas de degradación y vidas medias para cada experimento. Entre los hallazgos principales se encontró que la acción de la microbiota edáfica es la principal responsable de la degradación de estos insecticidas. En el caso del clorpirifos, demostró ser poco persistente y la atenuación natural logra concentraciones inferiores a límite de detección. El endosulfán persistió en bajas concentraciones. La biodegradación puede ser intensificada a través del agregado de materia orgánica (bioestimulación), el okara, un subproducto derivado de la soja, una vez hidrolizado es un bioestimulante efectivo para el clorpirifos; el bokashi, un abono orgánico, y la cama de pollo para el endosulfán. En todos los casos se detectó la acumulación de endosulfán sulfato. Estos resultados mostraron la gran cantidad de respuestas que puede tener un plaguicida en suelo incluso en condiciones controladas y que la tarea de descontaminar un suelo requiere de una estrategia hecha a medida.

Palabras clave: plaguicidas, organoclorados, organofosforados, biodegradación, atenuación natural, bokashi, okara, actividad enzimática.

Abstract

Title: Evaluation of strategies for bioremediation of Buenos Aires horticultural soils polluted with endosulfan and chlorpyrifos

The excessive and persistent use of pesticides results in serious soil pollution and deteriorated soil quality and environment. In Argentina, the increasing amount of studies are showing pesticide detection in surface and ground water, sediments, aquatic and terrestrial biota. Therefore, is relevant to study pesticide dynamics in soil and evaluate possible mitigation strategies to prevent soil from acting as nonpoint source of pollution and to ensure food safety. The aim of the present thesis was to evaluate bioremediation strategies to accelerate the degradation of two of the most used insecticides in the country for a decade, the organochlorine endosulfan and organophosphorus chlorpyrifos. The experiments were mostly

in microcosm using soil from the La Plata horticultural belt and known doses of pesticides were applied. Extraction methodologies were settled and the analyzes were performed by GC-ECD. Natural attenuation, biostimulation and phytoremediation of these compounds were studied, and degradation curves and half-lives were obtained for each experiment. Among the main outcomes, it was found that the action of the edaphic microbiota is the main responsible for the degradation of these insecticides. In the case of chlorpyrifos, it proved to have low persistence and with natural attenuation, it degraded to concentrations below the detection limit. Endosulfan persisted in low concentrations. Biodegradation can be intensified through the addition of organic matter (biostimulation), for chlorpyrifos the hydrolyzed okara, a by-product from the soy processing, is an effective biostimulant; and bokashi, an organic amendment, and poultry litter for endosulfan. In all cases endosulfan sulfate accumulated in soil. These results revealed the great number of responses that a pesticide can have on the ground even under controlled conditions and that the task of decontaminating a soil requires a tailored strategy.

Keywords: pesticides, organochlorine, organophosphorus, biodegradation, natural attenuation, bokashi, okara, enzymatic activity.

Capítulo 1. Introducción general

En el último siglo los plaguicidas se han convertido en un componente importante de la agricultura a nivel mundial permitiendo un notable aumento en los rendimientos de cultivos y en la producción de alimentos (Alexandratos y Bruinsma 2012) pero su persistente y excesivo uso causa una grave contaminación del suelo cultivable y un deterioro de la calidad de éste, y del ambiente (Niti et al. 2013). La contaminación y el impacto de los plaguicidas en ecosistemas terrestres, acuáticos –incluyendo los marinos costeros- y también de sus efectos tóxicos sobre humanos y biota no blanco (Carvalho 2017) ha sido motivo de estudio en los últimos años. Si bien la tendencia es reducir el uso de plaguicidas persistentes y reemplazarlos por compuestos menos tóxicos y rápidamente degradables, hay evidencia suficiente sobre la existencia de un pasivo ambiental global de estos compuestos y sus residuos que afecta la calidad de los alimentos y el agua, y pone en riesgo la salud humana (Comisión Europea 2006; UNEP/AMAP 2011; USGS 2015; INTA 2015; Bisht, Palni y Harsh 2018).

En general, existen dos clases de contaminación que el uso plaguicidas puede originar. La primera es la contaminación "puntual", originada por derrames accidentales durante el transporte de envases y recipientes, o en la preparación, el manejo y la eliminación de las mezclas aplicadas. La segunda es la denominada contaminación "difusa", que se produce después de las aplicaciones convencionales sobre el cultivo (Stoorvogel et al. 2003). Ejemplos de contaminación difusa son los producidos por lixiviación, escorrentía y deposición en suelo, agua o follaje y también de plaguicidas volatilizados a la atmósfera que han sido transportados por el viento (Darder et al. 2016). El suelo es un recurso natural no renovable a escala de la vida humana que se puede conceptualizar como un biorreactor fisicoquímico con funciones potenciales de filtración, amortiguación, depuración y

regulación de los ciclos biogeoquímicos (INTA 2015). La medida en que los plaguicidas son susceptibles de ser transportados a través y desde el suelo, contribuyendo a la contaminación difusa, depende de los procesos de biodegradación y sorción que determinan respectivamente la longevidad y movilidad del plaguicida dentro del suelo (Lupi et al. 2016). El suelo opera como una interfase entre el aire y el agua y provoca un impacto en estos dos recursos vitales (Rapaport y Eisenreich 1988; Botello et al. 2005), por lo que no sólo es prioridad eliminar el uso de sustancias tóxicas persistentes, sino que se deben estudiar estrategias de descontaminación del mismo. En la actualidad tan solo el 1% de los estudios de plaguicidas publicados en los últimos 26 años, se enfocaron en la remediación y de éstos, un 50% se concentra en los últimos 6 años (datos propios). Estos datos demuestran que hubo un cambio en el foco de interés de la comunidad científica.

El término plaguicida cubre un rango amplio de compuestos como insecticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas, molusquicidas, nematicidas y otros. El presente trabajo hace foco sobre dos insecticidas, el endosulfán – un organoclorado- y el clorpirifos -un organofosforado-, que fueron hasta el 2012 y durante una década dos de los tres más vendidos en la Argentina (CASAFE 2012). El endosulfán es un sulfito cíclico clorado ampliamente usado en todo el mundo en cultivos de frutas, hortalizas, y en cultivos extensivos de grano como el trigo y la soja. El endosulfán de grado técnico consiste en dos estero isómeros, α - y β -endosulfán (con relaciones entre 2:1 y 7:3) con tiempos de persistencia que difieren entre sí, siendo el β -endosulfán el más persistente (Awasthi 2000). Ambos tienen baja movilidad en suelos, quedando retenidos en los primeros 0,10 m (NRA 1998). Los principales metabolitos durante la degradación bacteriana son el endosulfán diol, endosulfán éter, endosulfán hidroxietér, endosulfán lactona, endosulfán dialdehído y endosulfán sulfato

(Martens 1976) (Fig 1.1). Este último fue identificado como el principal metabolito en suelos, y es producto de la oxidación por parte de los microorganismos nativos (Ismail et al. 2000; Lee et al. 2006). Al igual que su compuesto parental es absorbido por plantas y acumulado en tejido de biota terrestre y acuática (Singh y Singh 2014; Lupi et al. 2016); tiene una polaridad menor (0,22 mg/L) que su compuesto parental y un peso molecular mayor (422,9) (Martens 1976). Por lo que también es persistente y tóxico, motivo por el cual está en la lista de Compuestos Orgánicos Persistentes del Convenio de Estocolmo (UNEP/AMAP 2011) junto con el endosulfán.

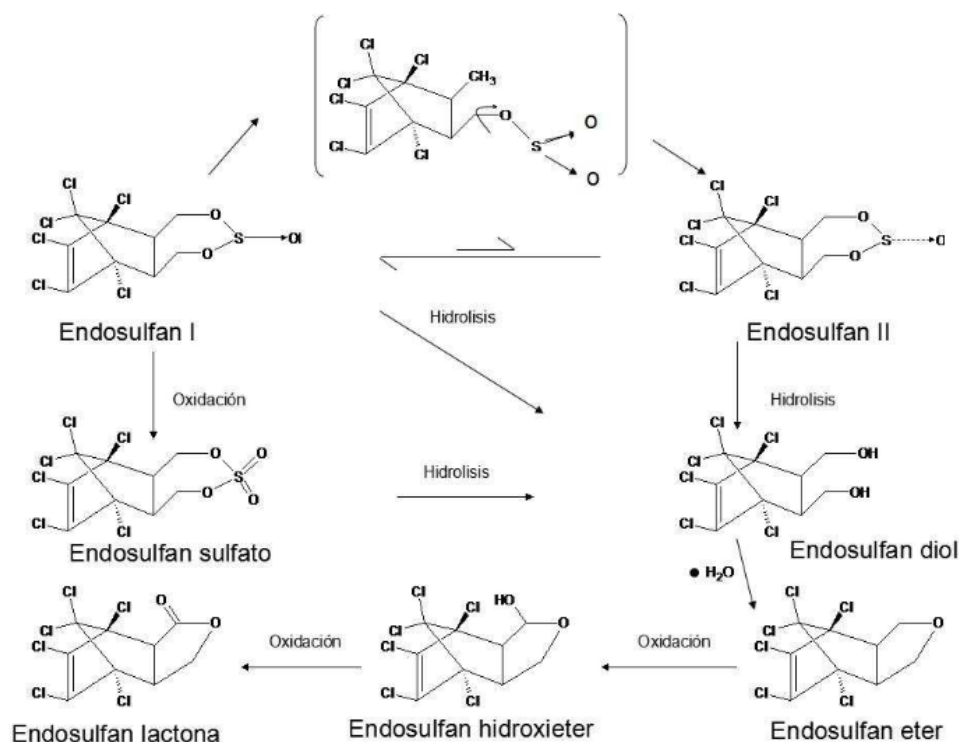


Fig.1.1: Rutas de degradación del endosulfán (tomado de Querejeta G. 2015)

Luego de la prohibición que estableció discontinuar el uso de endosulfán en 2013 en el territorio argentino, ya no existen estadísticas actualizadas sobre su uso. La OMS lo clasifica como Categoría II –Moderadamente Peligroso (WHO 2009) y la clasificación de la EPA es

de Categoría I: "Alta toxicidad aguda" (US EPA 2002). El endosulfán ha sido detectado en la atmósfera (Tombesi et al. 2014; Astoviza et al. 2016), suelos, sedimentos (Miglioranza et al. 2013; Arinaitwe et al. 2016), en agua superficial (Mugni et al. 2011, Hunt et al. 2016) y de lluvia, así como en alimentos (Bulut et al. 2010) y en tejido graso humano, leche materna y placenta (Cerrillo et al. 2005). Es extremadamente tóxico para la biota acuática (Sunderam et al. 1992; Crupkin et al. 2013; Jones et al. 2016), tóxico también para la vegetación acuática (Menone et al. 2008) y hay evidencias de toxicidad gonadal en mamíferos (Sinha et al. 1997), genotoxicidad (Chaudhuri et al. 1999), y neurotoxicidad (Pual y Balasubramaniam 1997). Su persistencia es variable y depende de múltiples factores pero se han registrado tiempos de vida media de entre 60-800 días. (Rao y Murty 1980). Recientemente se descubrió la capacidad de fitoextracción de algunas plantas comestibles sobre el endosulfán (Mitton et al. 2016) lo cual amenaza seriamente la seguridad alimentaria. La cantidad de sitios impactados en el mundo (Wang et al. 2007) y la variabilidad en cuanto a tipo de suelos, climas y otras condiciones en las que se halla el endosulfán, hacen que la detoxificación del endosulfán sea un tema de estudio al que la comunidad científica debería dirigirse.

El clorpirifos es un insecticida y acaricida organofosforado no sistémico utilizado para controlar plagas de insectos en cultivos de hortalizas, frutas, de granos, algodón, así como árboles y plantas ornamentales de jardín. Es tóxico para aves, crustáceos (Mugni et al. 2011, Negro et al. 2019), mamíferos y un posible carcinogénico (ATSDR 2010), y Categoría II – Moderadamente Peligroso según la OMS (WHO 2009). Se probó que los niños expuestos al clorpirifós en el útero tienen un mayor riesgo de retrasos en el desarrollo mental y motor a los tres años y una mayor incidencia de trastornos generalizados del desarrollo como el TDAH (trastorno por déficit de atención con hiperactividad) (Rauh et al. 2006). Hay un amplio rango de vidas medias reportado en la literatura para persistencia en el suelo, que va

de unos pocos días hasta 4 años, en dependencia de la tasa de aplicación, el tipo de ecosistema y factores ambientales varios (Gebremariam et al. 2012). Numerosos estudios lo han encontrado en nieve y en lagos del Ártico (Muir et al. 2007), en suelo, aguas subterráneas, superficiales y sedimentos de ríos (Jergentz et al. 2005; Marino y Ronco 2005; Williams et al. 2014), incluso en dosis con efectos nocivos para la comunidad de invertebrados acuáticos (Álvarez et al. 2019). En los últimos años se observa un aumento en la preocupación por el uso de clorpirifos. En EE.UU grupos ambientalistas están presionando a la Agencia de Protección Ambiental para que prohíba su uso y en 2018 Hawai fue el primer estado en hacerlo (PAN-NA 2018). En la Unión Europea se restringió su uso a una menor cantidad de cultivos y disminuyó el límite máximo de residuos en productos para el consumo (Comisión Europea 2016).

Conocer las propiedades físico-químicas intrínsecas de cada plaguicida permite tener una primer aproximación del destino potencial de cada molécula en el ambiente (Aparicio et al. 2015). Las principales propiedades a tener en cuenta son:

Estructura química: La ventaja de clasificar a los plaguicidas según su estructura química reside en la posible identificación de las sustancias que pueden tener efectos similares en las plagas y el ambiente.

Solubilidad en agua: Este parámetro se tiene en cuenta para evaluar la potencial de disipación, por lixiviación, del plaguicida disuelto en agua.

Kow: El coeficiente de partición octanol / agua refiere a la relación entre las concentraciones de una sustancia en octanol y en agua. Representa el balance entre la afinidad de un compuesto por la fase acuosa y la fase lipídica. Valores altos de Kow indican un comportamiento hidrófobo mientras que valores pequeños indican un comportamiento hidrófilo. Estos valores pueden alcanzar unos cuantos órdenes de magnitud por lo que se le

usa comúnmente el Log Kow y el rango queda comprendido entre -3 (altamente hidrofílico) hasta +10 (altamente hidrofóbico) (Cumming y Rücker 2017).

Koc: El coeficiente de partición entre la materia orgánica (carbono) del suelo y el agua, permite evaluar la capacidad de retención de una sustancia en las partículas del suelo o sedimentos en contacto con agua. El Koc es especialmente útil para plaguicidas no ionizables, que se adsorben directamente sobre la materia orgánica del suelo. Valores altos implican mayor adsorción (>5) y por lo tanto será menos móvil y valores bajos (<1) baja afinidad por el suelo.

Volatilización: representa la tendencia de una sustancia a pasar al estado gaseoso. Esta propiedad se mide a través de la constante de Henry (H) que permite relacionar la distribución de una sustancia entre una fase acuosa y una gaseosa. Un valor alto de H, indica que un plaguicida tiene un potencial elevado para volatilizarse.

Presión de vapor: Es la presión a la cual una sustancia pura y su vapor pueden existir en equilibrio. Este parámetro da una idea de la potencial disipación de un compuesto hacia la atmósfera, pues a mayor presión de vapor mayor volatilidad.

Persistencia: En el caso de los plaguicidas, se define como la capacidad de estos de conservar sus características físicas, químicas y funcionales en el suelo, aire o agua durante un período limitado de tiempo, luego de ser aplicados. Se mide a través del tiempo de vida media ($t_{1/2}$), que representa el tiempo que tarda en alcanzar la mitad de la concentración inicial. Depende de procesos tales como fotodegradación, hidrólisis, degradación microbiana y oxidoreducción. Los plaguicidas con mayor $t_{1/2}$ son altamente persistentes en el ambiente y con mayor potencial de lixiviación o de erosión hídrica.

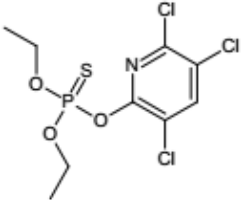
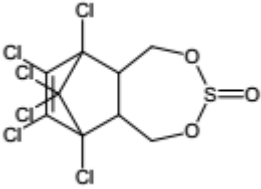
Capacidad de adsorción a partículas del suelo: esta propiedad se evalúa a través del

Coeficiente de distribución (Kd). La determinación del Kd para cada plaguicida se realiza en experimentos denominados de *batch*, que se basan en la agitación de una disolución acuosa conteniendo el plaguicida, con una cantidad determinada de suelo. Luego, se calcula la relación entre la concentración del plaguicida en la fase acuosa y la concentración del plaguicida que ha sido adsorbido al suelo. Los valores de Kd determinados para cada plaguicida no son constantes y varían en función de las propiedades de los suelos. De esta manera, los Kd pueden ser normalizados en base al contenido de materia orgánica del suelo, obteniéndose así la constante de adsorción al carbono orgánico Koc, aplicable a todo tipo de suelo. Ambos se expresan en unidades de volumen por masa (cm^3g^{-1}) y, mientras mayor es el Kd, mayor es la adsorción del plaguicida al suelo. Para el cálculo del Kd se considera que la adsorción al suelo es proporcional a la concentración inicial del compuesto, sin embargo, cuando no se cumple esta relación lineal, se modifica el procedimiento para el cálculo de la adsorción, y el coeficiente se expresa como Kf (Aparicio et al. 2015).

A continuación, en el cuadro 1.1 se presentan algunas de las propiedades mencionadas en los párrafos anteriores para el clorpirifos y el endosulfán:

Cuadro 1.1: Propiedades físico-químicas de los plaguicidas de estudio. Fuente: PPDB (Pesticide Properties DataBase).

| | Clorpirifos | Endosulfán |
|--|-------------------------|-----------------------------|
| CAS N° | 2921-88-2 | 115-29-7 |
| Estado | Cristales blanco a ocre | Cristales incoloro a marrón |
| Masa molar (g/mol) | 350,6 | 406,9 |
| Solubilidad en agua (20 °C) mg.L ⁻¹ | 1,05 (bajo) | 0,32 (bajo) |
| Log K_{ow} a pH=7 y 20 °C | 4,7 (alto) | 4,75 (alto) |
| Pebullición | Se descompone antes | Se descompone |
| Presión de Vapor (25 °C) mPa | 1,43 (baja volatilidad) | 0,83 (baja volatilidad) |

| | | |
|---|---|---|
| Constante de Henry (25 °C) Pa. m ³ . mol ⁻¹ | 0,478 (volátil moderado) | 1,48 (volátil moderado) |
| Log K_{oc} | 3,9 | 4,03 (alfa) y 4,13 (beta) |
| Estructura |  |  |

En Argentina, el entramado de explotaciones hortícolas que rodea a las grandes ciudades se lo denomina “cinturón verde” (Souza Casadinho 2012; Benencia et al. 2009; INTA 2017). En el cinturón verde bonaerense alrededor de 1.500 empresas hortícolas se emplazan en unas 16.000 hectáreas que ocupan intersticios rural-urbanos de su borde exterior (segundo y tercer cordón metropolitanos) y abastecen al 30% de la demanda urbana. Esta actividad se basa en el cultivo intensivo de productos en explotaciones de tipo familiar (Feito 2013), y actualmente se reconoce que el alto uso de agroquímicos constituye uno de los aspectos distintivos más importantes de la horticultura bonaerense en general (Souza Casadinho y Bocero 2008; DP-UNLP 2015). En particular el cinturón hortícola bonaerense del sur, que abarca los partidos de La Plata, Florencio Varela, Berazategui y Esteban Echeverría -en orden de hectáreas productivas- incluye partidos que han sido calificados en un informe técnico como aquellos con mayor índice de peligrosidad total debido a la cantidad y la toxicidad de los plaguicidas aplicados (DP-UNLP 2015). En el Área Metropolitana de Buenos Aires, se han encontrado plaguicidas en agua subterránea de los acuíferos Puelche y Pampeano y el endosulfán es uno de ellos (Acumar 2009), posiblemente como consecuencia de la lixiviación desde los suelos y el escurrimiento superficial (Jergentz et al. 2005). Como consecuencia de la expansión de las ciudades, cabe esperar que estos suelos con historia de uso intensivo de plaguicidas algún día tengan un uso urbano que les exija un umbral de

calidad mayor (Frediani 2009). Si estos no son monitoreados y remediados, seguirán actuando como fuente de contaminantes y difícilmente puedan alcanzar una calidad que garantice la salud de sus habitantes.

Entre los métodos evaluados para la remediación o mitigación de estos insecticidas, la acción microbiana es la más prometedora ya que puede degradar la molécula en compuestos de menor toxicidad hasta su completa mineralización. Ya se han identificado y aislado cepas bacterianas y fúngicas que utilizan endosulfán como fuente de carbono en medio acuoso (Siddique et al. 2003; Glick 2010; Kumar 2011; Rivero et al. 2012; Kong et al. 2013), y en menor medida en suelo (Kumar et al. 2008). La bioestimulación es una estrategia de remediación que estimula la actividad de la microbiota nativa mediante la adición de enmiendas orgánicas y/o inorgánicas con el objetivo de remover el plaguicida del suelo (Tejada et al. 2011a; 2011b; 2014; Gómez et al. 2014). Por un lado, la mineralización de esta materia orgánica libera nutrientes que estimulan el crecimiento de microorganismos tolerantes a xenobióticos, provocando una aceleración en su degradación. Por otra parte, la adición de materia orgánica es capaz de adsorber dicho plaguicida, reduciendo su movilidad y consecuentemente su toxicidad (Delgado-Moreno y Peña 2009; Gómez et al. 2014). Esta parece ser una estrategia interesante ya que aprovecha a los consorcios bacterianos nativos. En este sentido, hay evidencias que demuestran que los consorcios son más eficientes en la degradación de endosulfán que las cepas individuales aisladas (Kumar y Philip 2006), además se considera una estrategia no invasiva y de bajo costo. Por último, una ventaja mas que tiene esta estrategia es el potencial de valorizar distintas corrientes de residuos orgánicos adecuándose a la denominada economía circular (Comisión Europea, 2015). Existen trabajos realizados en microcosmos en los que la adición de enmiendas orgánicas de distintos orígenes

ha dado resultados exitosos en cuanto al aumento de biodisponibilidad del contaminante y la consecuente metabolización (Scelza et al. 2008; Tejada et al. 2011). Los trabajos publicados sobre endosulfán abundan respecto a su detección y distribución, incluso se han aislado cepas bacterianas degradadoras, pero a la fecha no se conocen estudios de bioestimulación en microcosmos.

Otro enfoque para la descontaminación de suelos es la fitorremediación, es decir, el uso de plantas para biorremediar un entorno. Esta estrategia se basa en los mecanismos fisiológicos y bioquímicos de la propia planta o de los microorganismos asociados a su raíz (rizósfera) (Pivetz 2001; Fan et al. 2008). Por ejemplo, se ha demostrado que algunas plantas pueden absorber endosulfán y/o sus metabolitos, disminuyendo así la concentración del contaminante en el ambiente (Ramírez-Sandoval et al. 2011; Somtrakoon et al. 2014); y que la acción conjunta de la rizósfera junto al consorcio bacteriano y fúngico asociado, aceleran la disipación de plaguicidas como el clorpirifos entre otros (Fulekar 2014). *Miscanthus x giganteus* es una gramínea originaria de Asia, C4 perenne que puede crecer en suelos de baja calidad o contaminados y es no invasiva (Lewandowski y Schmidt 2006). Se la cultiva para la construcción, para fines agrícolas y para su aprovechamiento energético (Nsanganwimana et al. 2014). Este último es el motivo por el cual se la está estudiando en EE. UU. y países de la Comunidad Europea. Si se tienen en cuenta estas características junto con la capacidad de secuestrar contaminantes inorgánicos en su sistema radicular y de inducir la disipación de compuestos orgánicos persistentes (Techer et al. 2012) se hace muy interesante la opción de evaluar esta especie como planta fitorremediadora de plaguicidas. Respecto a esto, no se han encontrado estudios de *Miscanthus x giganteus* sobre la disipación de ningún plaguicida utilizado en prácticas de agricultura.

Al aplicar una estrategia de descontaminación, como lo es la remediación, es importante monitorear cambios en las propiedades del suelo debido a que pueden indicar efectos benéficos o perjudiciales de ese manejo (McCool et al. 2008) por lo cual es relevante seleccionar propiedades del suelo que actúen como indicadores de calidad. Una de estas propiedades es la actividad metabólica dado que mantienen una mayor sensibilidad frente a procesos como la contaminación (García et al. 1994). Las enzimas del suelo se consideran muy útiles para monitorear cambios en la actividad microbiana y ofrecen información sobre la capacidad potencial del suelo para llevar a cabo reacciones específicas (García y Hernández 2000). La enzima deshidrogenasa es una enzima intracelular por lo que se considera que la medida de su actividad proporciona información sobre la actividad microbiana de las poblaciones del suelo. Por otro lado, Brookes (1995) recomienda combinar parámetros microbiológicos de actividad (por ejemplo: respiración) y de población (biomasa bacteriana) para obtener indicadores más sensibles a la contaminación del suelo. Estos indicadores además de aportar información sobre el efecto del endosulfán aplicado al suelo sirven para evaluar el efecto de las técnicas remediadoras en las comunidades bacterianas e indirectamente en la calidad del suelo.

1.1. Objetivos

El presente trabajo tiene como **objetivo general** evaluar empíricamente técnicas compatibles con la agricultura que aceleren la degradación de un plaguicida órgano fosforado (clorpirifos) y un organoclorado (endosulfán) presentes en suelo a bajas concentraciones. Este enfoque podría conducir a soluciones de remediación *in situ* y disminuir la potencial contaminación difusa proveniente de la actividad agrícola. Para ello se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. **Objetivo:** Obtener datos de detección de endosulfán total (isómeros α -, β -, y endosulfán sulfato), y clorpirifos en suelo de cinco establecimientos hortícolas con producción convencional del área en estudio para saber sobre su persistencia.

2. **Objetivo:** Estudiar la disipación de estos plaguicidas en un suelo hortícola convencional y evaluar en qué proporción la degradación microbiana participa de la atenuación natural.

3. **Objetivo:** Conocer y comparar tasas de degradación de estos mismos plaguicidas en un suelo hortícola de producción convencional, suelo hortícola sin uso de agroquímicos (producción orgánica) y uno proveniente de una reserva natural con uso recreativo.

4. **Objetivo:** Comparar la degradación del endosulfán y del clorpirifos en ensayos de microcosmos ante la aplicación de diferentes enmiendas orgánicas y evaluar la fitotoxicidad de dichas enmiendas.

5. **Objetivo:** Evaluar a *Miscanthus x giganteus* como potencial fitorremediadora de suelo con aplicación de endosulfán.

6. **Objetivo:** Aislar de un suelo hortícola con historia de uso, cepas bacterianas tolerantes a endosulfán y evaluar su capacidad degradadora.

1.2.Hipótesis General

Si bien la prohibición de utilización del endosulfán en Argentina fue en el año 2013, este compuesto y su metabolito endosulfán sulfato persisten en suelos hortícolas. El clorpirifos, de uso frecuente, se espera que esté presente en los mismos. Mediante las técnicas de bioestimulación y fitorremediación ensayadas en este estudio es posible acelerar la degradación del endosulfán y la del clorpirifos.

1.3.Diseño de la tesis

La tesis está compuesta por seis capítulos, en la introducción general (Capítulo 1) se brindan antecedentes sobre el impacto de los plaguicidas en el ambiente, su amplia distribución global y algunas aproximaciones para la remediación de suelos impactados con compuestos orgánicos persistentes. En el Capítulo 2 se describe la zona de estudio y el relevamiento de suelo que se realizó en cinco establecimientos hortícolas para establecer presencia de endosulfán y clorpirifos. En el Capítulo 3 se estudió la atenuación natural de ambos insecticidas en tres suelos de la zona y se realizaron los trabajos preliminares para una bioaumentación, es decir se aislaron y purificaron cepas bacterianas con capacidad de degradar endosulfán. El Capítulo 4 propone diferentes fuentes de materia orgánica como potenciales bioestimulantes y el Capítulo 5 evalúa una planta de interés económico como fitorremediadora de suelo con endosulfán. Finalmente, en el Capítulo 6 se da una discusión general sobre los principales resultados y se enumeran las conclusiones derivadas del trabajo, se proponen futuros estudios y se ofrece una reflexión final.

Capítulo 2. Detección de plaguicidas persistentes en suelo de establecimientos productivos del cinturón hortícola platense

2.1. Introducción

La horticultura periurbana localizada en el segundo cordón del Gran Buenos Aires (GBA) cumple un rol fundamental en el abastecimiento de frutas y verduras de la ciudad de Buenos Aires y su cordón metropolitano (Benencia et al. 2009; Souza Casadinho 2012; OPDS 2013; INTA 2017). Esta localización de cinturones hortícolas se repite en otras grandes ciudades de Argentina, como La Plata, Santa Fe y Mendoza. En general la actividad hortícola es desarrollada por pequeños productores en huertas usualmente inferiores a cinco hectáreas, con bajo grado de tecnificación y recursos humanos con un alto componente inmigratorio (Feito 2013). En la Figura 2.1 se muestra un mapa con la localización de los distintos partidos de la región metropolitana de Buenos Aires que dedican parte de su superficie a la producción hortícola o florícola.

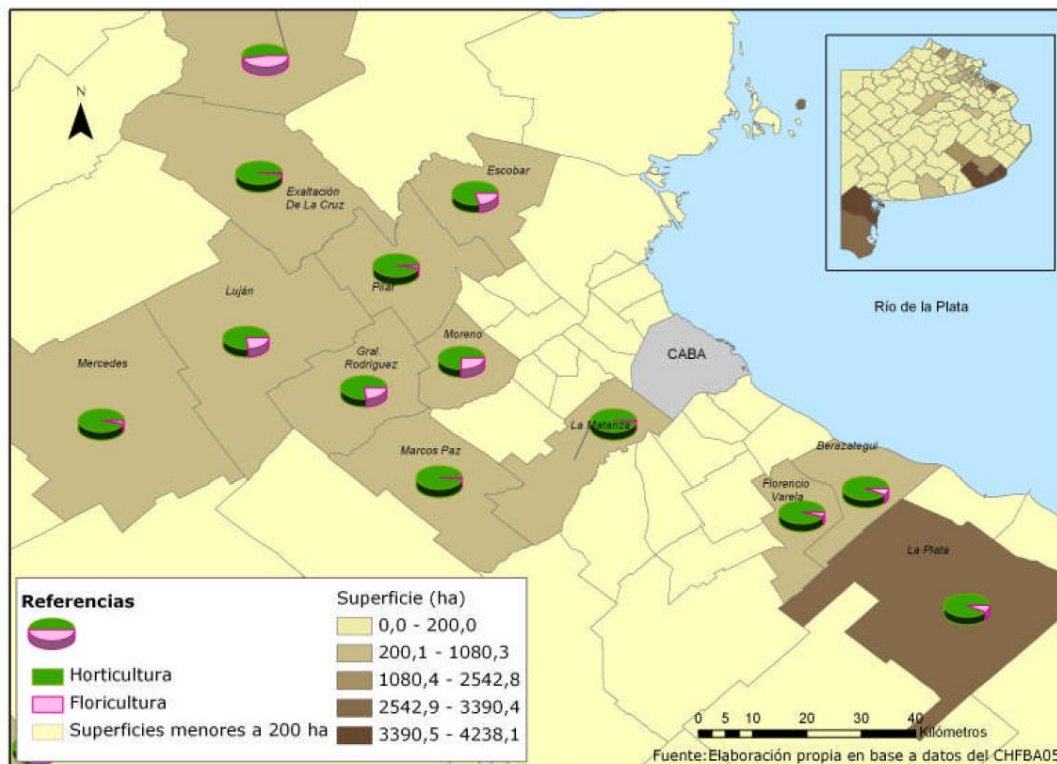


Fig.2.1: Superficie de la provincia de Buenos Aires dedicada a la actividad hortícola y florícola (Flores 2013)

Puntualmente, respecto al cinturón hortícola platense, el informe de la Defensoría del Pueblo de la Prov. de Buenos Aires (DP-UNLP 2015) dedica un párrafo respecto al uso de plaguicidas y el modo de producir. Allí se sintetiza la situación de uno de los partidos de la provincia que más hectáreas dedica al cultivo hortícola. Basándose en entrevistas a productores y agrónomos nos informa que:

La necesidad de presentar hortalizas de calidad determina la aplicación de plaguicidas, fundamentalmente insecticidas y fungicidas, siguiendo prácticas de “tipo calendario” sin atenerse al umbral de daño ecológico. Los productores deciden qué cultivos se deben proteger tanto como el producto a aplicar a partir de sus recorridas por la quinta o del análisis de la información provista por los trabajadores. Por último, un problema gravísimo se da en la fumigación de las hortalizas para consumo en fresco donde la combinación de la utilización de plaguicidas extremadamente tóxicos, las dosis de aplicación elevadas y, fundamentalmente, el no respeto del tiempo de carencia determinan que una elevada proporción de las hortalizas comercializadas en los alrededores del área metropolitana de Buenos Aires lleguen al consumidor con un tenor de plaguicidas más elevado que lo admitido por las disposiciones vigentes.

En dicho informe se obtuvieron Índices de Peligrosidad Hortícola, este indicador permite estimar la peligrosidad potencial de la actividad hortícola general de cada partido o zona y se basa en los cultivos predominantes y el tipo de manejo (modelo de producción) que se hace de cada uno de ellos. Los partidos de La Plata y Florencio Varela resultaron en primer y cuarto lugar en peligrosidad entre todos los partidos hortícolas bonaerenses debido a la cantidad y la toxicidad de los plaguicidas aplicados. Según un informe de la OPDS (2013) respecto a esta zona productiva, el endosulfán fue un insecticida de aplicación sistemática,

es decir, se realizaban varias aplicaciones por ciclo de cultivo de manera generalizada, en presencia o no de la plaga.

La prohibición del endosulfán en la Argentina se logró como resultado de presiones por parte de la Red de Acción en Plaguicidas de América Latina (Rapal) y la Red de Médicos de Pueblos Fumigados entre otras organizaciones, para que la Argentina como Estado parte del Convenio de Estocolmo (1) apoye la incorporación del endosulfán a la lista de compuestos orgánicos persistentes (COP) con su posterior prohibición. Como consecuencia, en 2011 el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, a través del SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) emitió la Resolución 511/2011 en la que se prohíbe a partir del 1° de julio de 2012, la importación del principio activo endosulfán y sus productos formulados; y la elaboración, formulación, comercialización y uso de los productos que contengan el principio activo endosulfán a partir de julio de 2013. Respecto a los valores aceptables en suelos, la Ley de Residuos Peligrosos (Ley 24.051) no establece límites de endosulfán para ninguno de los usos de suelo (residencial, agrícola e industrial).

En cuanto a la detección de plaguicidas, la cromatografía de gases (CG) presenta una gran sensibilidad y selectividad para el análisis de los plaguicidas. Durante los años de 1956 a 1962 se sientan las bases de esta técnica y en años posteriores se va perfeccionando notablemente con el uso de columnas capilares, técnicas de derivatización y los detectores específicos, por lo que se hace posible la detección de muchos compuestos difíciles de analizar, así como la determinación de sus residuos (Littlewood 1970; Moye 1981). Entre los detectores de CG más utilizados en el análisis de residuos de plaguicidas se encuentra el

¹ Espacio internacional auspiciado por la Organización de Naciones Unidas que regula el tratamiento de sustancias tóxicas

detector de captura de electrones (*electron-capture detector* o ECD). Su funcionamiento se basa en la emisión de una partícula β (electrón) por parte de isótopos de níquel como el ^{63}Ni adsorbido sobre una placa de platino o titanio. En este tipo de detector, se utiliza nitrógeno o metano al 5% en argón como gas portador de fase móvil. El gas pasa entre dos electrodos colocados en el extremo de la columna. El electrón colisiona y ioniza el gas portador para generar más iones que resultan en una corriente. Si se tienen especies orgánicas en el gas, con átomos electronegativos como fluor o cloro, éstos capturarán parte de los electrones, disminuyendo por tanto la intensidad de la corriente. Tanto el clorpirifos como el endosulfán tienen átomos de cloro en su composición y estos detectores se especializan en la detección de moléculas que contienen elementos electronegativos, especialmente halógenos (Higson 2004) resultando así adecuados para el trabajo de esta tesis. Otra técnica utilizada en la determinación de residuos de plaguicidas es la espectrometría de masas (*mass spectrometry*, MS) (Davis y Frearson 1987). La utilización de esta técnica tiene una gran importancia debido a la alta sensibilidad que presenta, capaz de obtener espectros de masas con cantidades inferiores a un nanogramo, por lo que este sistema se ha constituido como una herramienta de gran interés en la identificación de endosulfán en distintas matrices: nieve, muestras biológicas, suelo, sedimentos y agua (Weber et al. 2010; Bussian et al. 2015; Xu et al. 2017). El detector de masas, que usualmente se utiliza en el análisis de residuos de plaguicidas es un cuadrupolo, puede funcionar en el modo de barrido completo del espectro, que se utiliza para la confirmación de los residuos, pero la mayor sensibilidad se consigue cuando funciona en el modo de selección de iones (*selected ion monitoring*, SIM). En esta técnica no se realiza un barrido completo del espectro, sino que se registran sólo los iones preseleccionados, por lo que aumenta el tiempo disponible para registrar cada señal, y con ello la sensibilidad.

Para analizar los residuos de plaguicidas y otros compuestos orgánicos persistentes en suelo, se extraen de los distintos suelos utilizando técnicas convencionales como extracción por agitación o extracción con la ayuda de un Soxhlet. La extracción con disolventes en baño de ultrasonidos se ha aplicado con buenos resultados a la extracción de plaguicidas de muestras de suelo y otras matrices, presentando algunas ventajas sobre los sistemas anteriores (Lesueur et al. 2008). La sonicación proporciona un contacto más eficiente entre el suelo y el disolvente extractante, traduciéndose en una mayor recuperación de los analitos (Johnsen y Starr 1972; Babic et al. 1998).

Como se mencionó en el capítulo anterior, la presencia de plaguicidas tóxicos, bioacumulables y persistente en suelo es motivo de preocupación debido a su demostrada absorción y translocación desde el suelo hacia varios cultivos comestibles y a la migración hacia otros compartimentos ambientales, incluyendo la biota terrestre. En el presente trabajo el mayor esfuerzo estuvo en evaluar estrategias de descontaminación y en este capítulo en particular, obtener datos propios de detección en huertas de la zona que hubieran usado endosulfán.

2.1.1 Objetivo

El objetivo fue obtener datos propios de detección de endosulfán total (isómeros α -, β -) y su metabolito endosulfán sulfato, y clorpirifos en suelo de cinco establecimientos hortícolas con producción convencional de la zona hortícola platense.

2.1.2 Hipótesis

A pesar de su prohibición en 2013, se pueden encontrar en suelos hortícolas de la zona, residuos de endosulfán ya sea por su uso reciente o por su persistencia. Respecto al clorpirifos, se tiene en cuenta que su persistencia es variable, pero al ser de uso frecuente se espera encontrarlo.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1 Sitios de muestreo

Los establecimientos muestreados pertenecen al denominado “Cinturón hortícola platense” y están distribuidos en los partidos de Florencio Varela y La Plata, partidos cuyas densidades poblacionales son de 707 y 2242 hab/km² respectivamente (INDEC 2010). En ellos se producen hortalizas de manera convencional desde hace 20 años. Por convencional se entiende con aplicación de insumos químicos como fertilizantes, herbicidas, fungicidas e insecticidas y esto incluyó al endosulfán hasta su fecha de prohibición. Los cultivos típicos son tomate, pimiento, berenjena, perejil, brócoli, repollo, lechuga, alcaucil (imagen 2.1)



Imagen 2.1: Establecimiento hortícola de producción convencional del Partido de La Plata.

2.2.2 Muestreo y acondicionamiento de suelo

Entre el año 2016 y 2018, se visitaron cinco establecimientos de similares esquemas productivos en la zona hortícola platense. Según los productores entrevistados se utilizó endosulfán hasta su fecha de prohibición en el 2013. Cada establecimiento se dividió en tres áreas equivalentes y en cada una se tomó una muestra compuesta de entre 10 y 25 submuestras dependiendo del área a cubrir, siempre dentro de los lotes. Las muestras se tomaron con barreno a dos profundidades - excepto en una quinta- y su distribución fue al azar. La síntesis del muestreo se presenta en el cuadro 2.1.

Cuadro 2.1: Cuadro sintético del esfuerzo de muestreo y su distribución.

| | Superficie de la huerta (ha) | Profundidad (cm) | Nro. Muestras compuestas | Nro. Submuestras | Total (Nro. Muestras compuestas x Nro. Submuestras) |
|----------|------------------------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|---|
| Huerta 1 | 60 | 0-20 | 3 | 25 | 75 |
| | | 20-40 | - | - | - |
| Huerta 2 | 15 | 0-20 | 3 | 15 | 45 |
| | | 20-40 | 3 | 5 | 15 |
| Huerta 3 | 6,5 | 0-20 | 3 | 10 | 30 |
| | | 20-40 | 3 | 5 | 15 |
| Huerta 4 | 5 | 0-20 | 3 | 10 | 30 |
| | | 20-40 | 3 | 5 | 15 |
| Huerta 5 | 5 | 0-20 | 3 | 10 | 30 |
| | | 20-40 | 3 | 5 | 15 |
| Total | | | 27 | | 270 |

Una vez rotuladas las muestras, se secaron al aire entre 48 y 72 horas; el total de cada muestra se tamizó a través de una malla de 2mm para separar raíces, animales, rocas, plásticos y otros residuos del suelo. Para obtener un volumen menor de la muestra y que siga siendo representativo, se utilizó el método del cuarteo, éste consiste en homogenizar el total de la muestra, dividirlo en cuatro partes iguales (en forma de cruz) y conservar dos cuadros opuestos descartando a los otros dos. En este caso la operación se repitió hasta obtener un tamaño de muestra de 100 g cada una. Todas se conservaron a -18 °C para evitar la degradación de los posibles plaguicidas presentes, hasta el momento de su análisis.

2.2.3 Análisis de plaguicidas en suelo

Todas las determinaciones de plaguicidas se realizaron en el Instituto de Ciencias de la Universidad Nacional General Sarmiento (UNGS). Tomando como punto de partida a la técnica de CG descrita en Ramos et. al (2015), se puso a punto la técnica de extracción y el método cromatográfico para la determinación de endosulfán (isómeros y endosulfán sulfato)

y clorpirifos. La totalidad de las muestras se analizó por cromatografía gaseosa acoplada a captura de electrones (CG-ECD) y aquellas en las que se detectó picos en los tiempos de retención de los plaguicidas buscados, se las analizó por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas para confirmar mediante biblioteca.

2.2.3.1 Extracción de insecticidas del suelo

La eficiencia de extracción depende de algunos parámetros experimentales importantes con lo cual también fue investigado el efecto del volumen del solvente en relación con la muestra de suelo, el método de agitación, y el secado. Este ensayo se encuentra en el Material Suplementario A.

Con los resultados de los ensayos preliminares, se concluyó que la extracción más adecuada consistiría en tratar los 100 g de suelo obtenidos del cuarteo, con 200 mL de mezcla de ciclohexano y acetona previamente destilados (relación suelo: solvente 1:2). La relación entre los solventes fue 1:1 medidos con probeta. La mezcla se agitó mecánicamente con un agitador orbital a 280 rpm durante 20 minutos y luego mediante ultrasonificación durante 20 minutos. El extracto se filtró por una columna empaquetada con 1 g de sílica gel 60 (0,015-0,040 mm) y 0,5 g de sulfato de sodio anhidro como agente desecante.

Los extractos se inyectaron directamente sin concentrar en el CG-ECD.

2.2.3.2 Concentración del extracto

Aquellas muestras en las que se detectaron picos que potencialmente podrían ser los plaguicidas de interés, se volvieron a extraer según el punto 2.2.3.1. El sobrenadante se pasó a un balón de destilación que se conecta a un rotaevaporador con el objetivo de reducir el volumen (imagen 2.2). La temperatura del baño fue de 50 °C y el extracto se llevó a sequedad para luego re-suspenderlo en 2 mL de ciclohexano. El extracto concentrado se filtró por una

columna empaquetada con 1 g sílica gel 60 (0,015-0,040 mm) Merck® y 0,5 g de sulfato de sodio anhidro.



Imagen 2.2: Proceso de concentración del extracto en un rotaevaporador

2.2.3.3 Detección

Con el objetivo de identificar cualitativamente la presencia de endosulfán, endosulfán sulfato y clorpirifos en suelo, los extractos de las muestras de huertas se analizaron con un cromatógrafo gaseoso marca Perkin Elmer (Norwalk CT, USA), modelo Clarus 680 con detector de captura de electrones e inyector automático. Los límites de detección fueron 0,025 mg/kg para clorpirifos y 0,019 mg/kg para endosulfán, otros parámetros de validación se encuentran en Material suplementario J. El software utilizado fue el TotalChrom Navigator versión 6.3.2. El cuadro 2.2 describe las condiciones operativas del equipo.

Cuadro 2.2: Condiciones de trabajo del equipo de detección CG-ECD para las muestras de suelo de huerta

| Condiciones del CG | |
|--------------------------|---|
| Temperatura del inyector | 280 °C |
| Gas Portador | N ₂ a 30 psi |
| Volumen de inyección | 1 µL, splitless |
| Temperatura del horno | 190 °C por 1,5 min, 45 °C /min hasta 300 °C y luego 10 °C/min hasta 320 °C constantes por 2 min |
| Condiciones del ECD | |
| Temperatura detector | 375 °C |
| Flujo auxiliar | 30 mL/min |

Los extractos concentrados se analizaron con un cromatógrafo de iguales características pero acoplado a un espectrómetro de masas (CG-MS), marca Perkin Elmer (Norwalk CT, USA), modelo SQ8T con ionización por impacto electrónico y con inyector automático. Las condiciones de trabajo en el CG-MS se muestran en el cuadro 2.3. La columna utilizada también marca Perkin Elmer Elite Series ® fue modelo Elite-5MS 30 m de largo x 0,25 mm de diámetro interno, 0,25 µm de espesor de película, (95 % dimetilpolisiloxano - 5 % difenilpolisiloxano de fase estacionaria), de bajo sangrado.

La identidad de los plaguicidas presentes en los suelos de huerta se determinó por comparación con el tiempo de retención y espectro de masas de patrones puros (Sigma Aldrich ®). Además, se compararon los espectros obtenidos con los espectros de masas de la biblioteca del NIST (National Institute of Standards and Technology).

Cuadro 2.3: Condiciones de trabajo del equipo de detección CG-MS para las muestras de suelo de huerta. ES: endosulfán sulfato. TCP: 3,5,6-tricloro-2-piridinol.

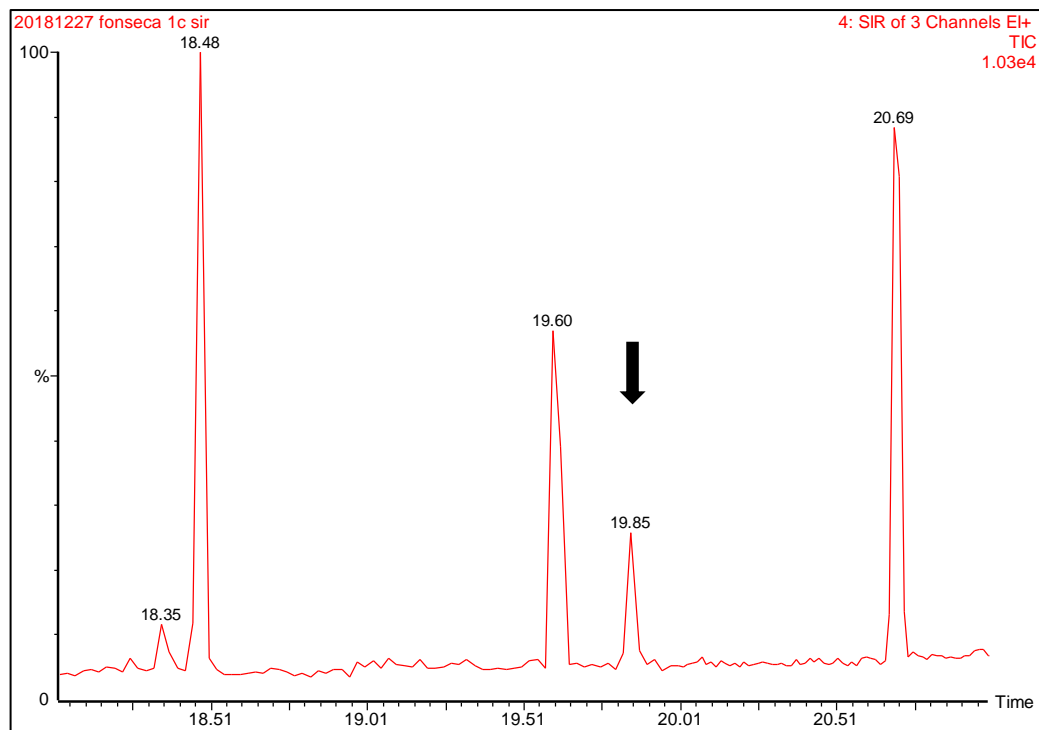
| Condiciones del CG | |
|---------------------------------------|--|
| Temperatura del inyector | 300 °C |
| Gas Portador | Helio flujo constante 10mL/min |
| Volumen de inyección | 1 µL |
| Temperatura del horno | 80 °C por 2 min; 10 °C/min hasta 300 °C y se mantuvo constante por 6 min |
| Condiciones del MS | |
| Solvent Delay | 2 min |
| Temperatura de línea de transferencia | 180 |
| Temperatura de la fuente de iones | 150 |
| MS | EI ⁺ , scan |
| Modo Scan | 50 a 300 umas |
| Modo SIR 1 (para clorpirifos) | Iones m/z 210,188,169 (uma/carga) |
| Modo SIR 2 (para endosulfán) | Iones m/z 195,241,339 (uma/carga) |
| Modo SIR 3 (para ES) | Iones m/z 422,387,272 (uma/carga) |
| Modo SIR 4 (para TCP) | Iones m/z 148,211,94 (uma/carga) |

2.3. Resultados

Los resultados del estudio de los plaguicidas en suelo de huerta arrojaron la detección de endosulfán sulfato en dos muestras de suelo de la Huerta 1 (cuadro 2.4), pertenecientes al mismo establecimiento y tomadas de los primeros 20 cm. El cromatograma y el espectro de masas se muestran en la figura 2.2 y 2.3. El pico del endosulfán sulfato se observa al minuto 19,85.

Cuadro 2.4: Resultados de detección de insecticidas en las huertas relevadas

| Huerta | Superficie (ha) | Profundidad (cm) | Nro. Muestras compuestas | Nro. Submuestras | Total | Detección de Plaguicida |
|--------|-----------------|------------------|--------------------------|------------------|-------|-------------------------|
| 1 | 60 | 0-20 | 3 | 25 | 75 | Endosulfán sulfato |
| | | 20-40 | - | - | - | |
| 2 | 15 | 0-20 | 3 | 15 | 45 | nd |
| | | 20-40 | 3 | 5 | 15 | nd |
| 3 | 6,5 | 0-20 | 3 | 10 | 30 | nd |
| | | 20-40 | 3 | 5 | 15 | nd |
| 4 | 5 | 0-20 | 3 | 10 | 30 | nd |
| | | 20-40 | 3 | 5 | 15 | nd |
| 5 | 5 | 0-20 | 3 | 10 | 30 | nd |
| | | 20-40 | 3 | 5 | 15 | nd |
| Total | | | 27 | | 270 | |

**Fig.2.2:** Cromatograma de corriente iónica total (TIC) de una muestra de suelo.

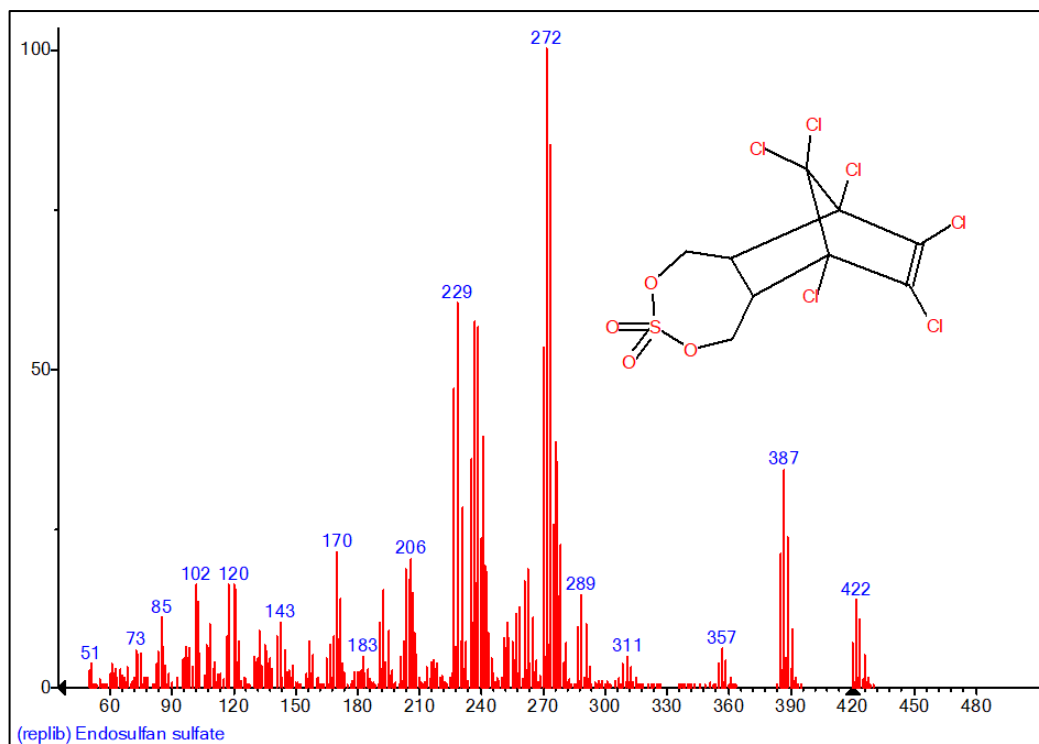


Fig. 2.3: Espectro de masas correspondiente al endosulfán sulfato (19,85 min) obtenido de la biblioteca de espectros de masa del NIST

2.4. Discusión

El objetivo de este capítulo fue obtener datos propios de detección de los plaguicidas de interés, y al mismo tiempo la puesta a punto de la metodología de análisis y detección que se utilizó durante la tesis. Respecto a los resultados, no haber detectado ni α ni β endosulfán ni endosulfán sulfato en la mayoría de los suelos analizados, da la pauta que posterior a su prohibición, la atenuación natural actuó efectivamente sobre el compuesto parental. Sin embargo, no deja de ser llamativa la no detección de clorpirifos, un insecticida de uso frecuente. También se hubiera esperado mayor frecuencia en la detección de endosulfan sulfato (ES), el principal metabolito de las transformaciones bióticas en condiciones aeróbicas (Tiwari y Guha 2013), alta persistencia y que aún se lo detecta en suelos agrícolas y en distintas matrices ambientales (Kim et al. 2014; Bussian et al. 2015; Lupi et al. 2016; Etchegoyen et al. 2017; MacLaughlin et al. 2018; Miglioranza et al. 2019). Respecto a las técnicas de extracción, fueron comparados distintos métodos de modo preeliminar y se optó por usar el de mayor eficiencia de recuperación; existe la posibilidad que la sensibilidad de detección no haya sido lo suficientemente alta por lo que concentraciones residuales inferiores al LOD hayan pasado inadvertidas (LOD clorpirifos 0,025 mg/kg y 0,019 mg/kg para endosulfán). No se han encontrado trabajos a nivel nacional que hayan relevado suelos agrícolas, y en particular hortícolas posterior a la prohibición en busca de endosulfán y ES por lo que no hay punto de referencia en este aspecto. Se resalta que la presencia de endosulfán sulfato aún en dosis menores a las cuantificables es motivo de preocupación por ser un riesgo para la seguridad alimentaria, y también es un desafío a futuro el trabajar para su descontaminación.

2.5 Conclusiones

Por lo anterior se concluye que el ES es efectivamente un compuesto más persistente que el parental en los suelos hortícolas platenses estudiados. La hipótesis del capítulo fue corroborada parcialmente en uno de los establecimientos. La ausencia de endosulfán (α , β y ES) en cuatro de las cinco huertas muestreadas invita a reflexionar sobre la importancia de una resolución como la 511/2011 que a través de la prohibición del endosulfán ha permitido la disipación de este COP a niveles menores que los detectables. La no detección de clorpirifos sugiere que existe suficiente disipación entre aplicaciones en suelo de huerta y bajo condiciones naturales.

Capítulo 3. Atenuación natural de clorpirifos y endosulfán en suelos con diferente historia de uso del cinturón hortícola de La Plata

3.1. Introducción

En los capítulos previos se introdujo el problema de los plaguicidas en el ambiente, su ubicuidad, su toxicidad y la necesidad de abordar el tema desde ámbitos académicos y gubernamentales. También se describió al suelo como biorreactor y en particular el suelo del cinturón hortícola platense como destino y fuente de plaguicidas tóxicos y persistentes. Esta tesis propone evaluar estrategias de biorremediación y para eso se consideró que la atenuación natural debía ser el primer fenómeno de descontaminación a estudiar.

La capacidad del suelo de reducir en masa, toxicidad, movilidad, volumen o concentración de contaminantes exógenos se define como capacidad de atenuación natural (NAC) según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA 1999). La atenuación natural generalmente involucra la disipación (2) de uno o más contaminantes en un determinado ambiente gracias a la actividad de los microorganismos nativos a través de rutas metabólicas complejas y efectivas, y también involucra a otros procesos abióticos naturales (Pimmata et al. 2013). En esta tesis también se denominará como capacidad degradativa a la capacidad de atenuación natural.

(2) Disipación, es la desaparición o no detección del compuesto en la matriz de interés, no da información sobre las causas o mecanismos. Aclaración: En esta tesis se utiliza el término “degradación” cuando se sabe que hubo transformación y “disipación” cuando se sabe que no se lo detecta pero se no intenta explicar el mecanismo.

En la figura 3.1 se muestran los posibles destinos de un plaguicida en el ambiente y los procesos a los que se somete.

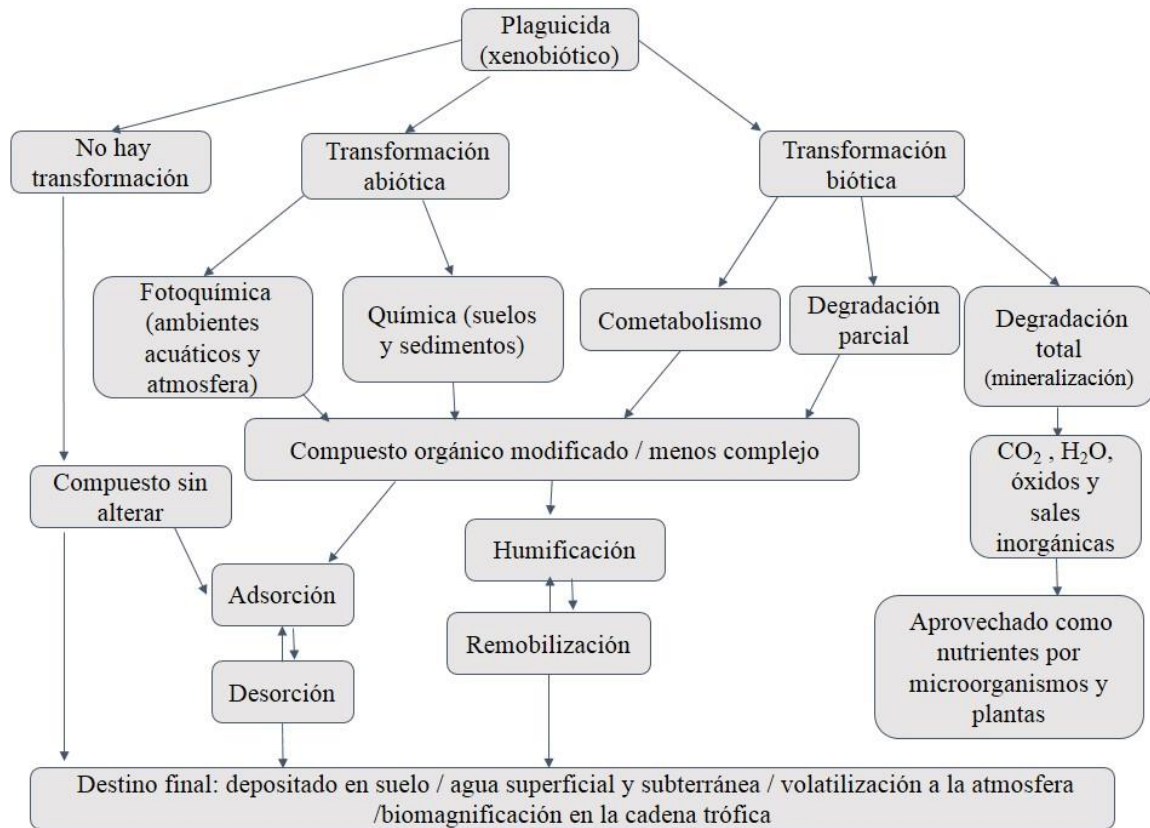


Fig.3.1: Esquema de las transformaciones de un plaguicida en el ambiente. Tomado y traducido de Verma et al. (2014)

Como se observó en la figura 3.1, los microorganismos -en especial las bacterias- tienen un importante rol en la descomposición de plaguicidas. En ambientes naturales, dicha biodegradación involucra la transferencia de sustratos y productos coordinadamente dentro de una misma comunidad microbiana en un fenómeno conocido como cooperación metabólica (Abraham et al. 2002). Los procesos por los cuales un plaguicida puede biodegradarse son principalmente tres: metabolismo, es decir, los microorganismos lo descomponen como una forma de detoxificación o para su utilización como fuente de energía o nutrientes (Parsek et al. 1995); el co-metabolismo, que es la biotransformación de una

molécula del plaguicida co-incidentalmente al funcionamiento normal del metabolismo microbiano (crecimiento, reproducción, dispersión) es decir sin obtención de energía o carbono a partir de esa molécula (Jaiswal et al. 2017); otra ruta de degradación puede estar mediada por enzimas secretadas al medio extracelular para la digestión de sustratos y que luego persisten en suelo aun después de muerta la célula parental. La estabilidad y persistencia de estas enzimas extracelulares pueden conferirle al suelo ciertas capacidades bioquímicas catabólicas (Racke y Coats 1990; Coats 1991).

En cuanto a la metodología empleada para el estudio de persistencia de sustancias químicas en suelo y agua, existe una aproximación a escala de laboratorio llamada microcosmos. Los microcosmos actúan como modelos del ecosistema en los que una porción del ambiente a estudiar se mantiene bajo condiciones controladas, por ejemplo, suelo prístino o suelo proveniente de un sitio contaminado (Tejada et al. 2014; Zhang et al. 2015; Tang et al. 2019). Este enfoque es muy útil para estudiar el rol de los microorganismos sobre la degradación de compuestos como plaguicidas, debido a que mantienen la complejidad a nivel de comunidad (Burrows y Edwards 2002). En el presente capítulo, como en la mayoría de los ensayos de esta tesis se optó por esta metodología.

La persistencia de un plaguicida en suelo dependerá de las características del plaguicida, las propiedades del suelo y la historia de contaminación de este. En el suelo, algunos plaguicidas son más susceptibles a ser degradados por poblaciones de bacterias adaptadas como consecuencia de una exposición reiterada en un fenómeno conocido como mineralización o degradación acelerada (Robertson y Alexander 1994; Arbeli y Fuentes 2007). Esta potencial adaptación de un suelo para la degradación de un plaguicida puede extenderse desde unas semanas hasta años luego de su aplicación (Walker y Welch 1991).

Existen trabajos que reportaron este fenómeno para el clorpirifos (Singh et al. 2003; Querejeta et al. 2014) pero no se hallaron trabajos que describan este fenómeno para endosulfán.

Los factores que influyen la persistencia del plaguicida son: la presencia de una comunidad de microorganismos con potencial degradador, la estructura molecular y propiedades físicas del plaguicida, su concentración, la biodisponibilidad, que es la capacidad de este para interactuar e inducir una respuesta (por ej: metabólica o de intoxicación) en un organismo vivo (Van Hamme 2004); condiciones ambientales como temperatura, pH y humedad del suelo, presencia de aceptores de electrones, co-sustratos, etc. (Castro et al. 2002; Ortiz et al. 2013; Villegas et al. 2014).

Dada la cantidad de factores mencionados y procesos operando simultáneamente sobre la disipación de un plaguicida, no es extraño encontrar en la literatura que los resultados son muy variables y en casos contradictorios; es por ello que el éxito de un proceso de biorremediación resulta altamente dependiente del sitio (o suelo estudiado), por lo que antes de una acción de biorremediación debería ser estudiado con detenimiento cada caso en particular. En la Argentina existe abundante literatura sobre herbicidas y se ha estudiado en detalle su comportamiento en suelo (Hang y Nasetta 2003; Rampoldi et al. 2014) sin embargo existen muy pocos trabajos sobre la degradación de insecticidas persistentes como endosulfán y clorpirifos en suelo. Se halló que Querejeta et al. (2014) y Álvarez et al. (2013) realizaron ensayos de degradación con clorpirifos en suelos de la provincia de Buenos Aires. No se encontraron a la fecha trabajos similares con endosulfán. Respecto a la zona hortícola platense, los trabajos relacionados con plaguicidas tienen que ver con su detección en alimentos o en otras matrices (Mac Laughlin et al. 2017, 2018) pero no se han encontrado

estudios sobre degradación de insecticidas y en particular clorpirifos y endosulfán, por lo que este capítulo se considera un aporte original en este campo.

Entre las técnicas de biorremediación se encuentra la bioaumentación que se trata de inocular poblaciones microbianas (cepas individuales o consorcios) altamente concentradas y especializadas para degradar el/ los compuestos recalcitrantes del sitio a remediar (Gentry et al. 2004). Esta estrategia es más adecuada para sitios que no tienen suficientes células microbianas o la población nativa no posee las rutas metabólicas necesarias para metabolizar los compuestos en cuestión. Como primer paso se aíslan las cepas mediante la técnica de enriquecimiento selectivo, y se las purifica para luego evaluar su capacidad degradativa en ensayos controlados. El método selectivo es una técnica con más de cien años de antigüedad e involucra el cultivo de muestras de suelo que contienen a la comunidad de interés y utilizando el contaminante que se desea estudiar como única fuente nutritiva. De este procedimiento se seleccionan cepas que hayan expresado la habilidad para degradarlo, al menos, bajo esas condiciones específicas (Thompson et al. 2005). Mediante esta técnica se han aislado cepas degradadoras de endosulfán como única fuente de azufre (Li et al. 2008), y otra gran cantidad de cepas capaces de utilizar al endosulfán como fuente de carbono o energía (Awasthi et al. 1997; Siddique et al. 2003; Kumar y Philip 2006; Jimenez-Torres et al. 2016). Cabe agregar que también es igualmente importante considerar el potencial de estas cepas purificadas para sobrevivir en el medio de interés una vez liberadas. En el presente Capítulo no se explora la técnica de bioaumentación pero sí el paso previo para ella, que es la obtención de cepas puras tolerantes y su evaluación como degradadoras a modo de trabajo preliminar para futuras investigaciones.

3.1.1 Objetivo general

La atenuación natural generalmente involucra la remoción de contaminantes de cierta matriz ambiental mediante la actividad de los microorganismos nativos y/o por acción de procesos abióticos. En este capítulo se apunta a esclarecer qué factores son responsables de la disipación del endosulfán y el clorpirifos en suelos de la zona de estudio, y por otro lado identificar microorganismos nativos con capacidad degradadora. Se espera que los resultados obtenidos sirvan como base para los estudios de biorremediación propuestos en los siguientes capítulos de esta tesis.

El capítulo se subdivide en dos partes debido a que se realizaron dos ensayos independientes y empleando técnicas muy distintas.

3.1.2 Objetivos específicos

PARTE A

- Evaluar en qué proporción la degradación microbiana participa de la atenuación natural mediante un ensayo de microcosmos.
- Conocer y comparar tasas de degradación de estos mismos plaguicidas en suelos de la zona de estudio con diferente historia de uso.
- Monitorear variables bioquímicas del suelo durante el ensayo como indicadores de actividad y abundancia microbiológica.

PARTE B

- Evaluar la capacidad degradadora de dos cepas bacterianas aisladas y purificadas de un suelo hortícola con historia de uso de endosulfán.

3.1.2 Hipótesis

La acción de los microorganismos presentes en suelo es la principal responsable de la degradación de endosulfán y clorpirifos. Ante la aplicación de plaguicidas, los suelos de uso convencional tienen mayor capacidad degradativa respecto a aquellos suelos hortícolas de producción orgánica (situación de referencia de un suelo sin uso de plaguicidas productivo) y uno no productivo.

PARTE A

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Suelo

Los suelos empleados en este ensayo se tomaron de tres sitios con diferente historia de uso dentro del cinturón hortícola platense en octubre de 2016. El primero fue un establecimiento comercial hortícola con producción de tipo convencional con una antigüedad mayor a 20 años (S 34° 51' 23,897", O 58° 16' 19,198"). Eso significa, uso intensivo de fertilizantes -orgánicos e inorgánicos, insecticidas, herbicidas y fungicidas. Según la entrevista con el dueño se empleó endosulfán con frecuencia hasta la fecha de su prohibición. Al momento de la entrevista aplicaba clorpirifos, trifluralina, dual gold y gesagard (herbicidas). El segundo sitio fue un establecimiento comercial hortícola de producción orgánica con 25 años de antigüedad, durante los cuales no se aplicaron fertilizantes inorgánicos ni plaguicidas (S 34°58'37,9", O 57°54'18,6"). El tercer sitio fue dentro del Parque Provincial Pereyra Iraola (S 34°51'24,9", O 58°07'49,2") con el objetivo de obtener un suelo de referencia; el parque es reserva de biosfera y su uso mayormente recreativo (imagen 3.1 a, b, c).





Imagen 1.1: a) Establecimiento productivo hortícola de tipo convencional. b) Establecimiento productivo hortícola de tipo orgánico. c) toma de muestras en Parque Pereyra Iraola considerado suelo de referencia de la zona.

3.2.1.1. Muestreo y acondicionamiento

Los muestreos se realizaron en lotes productivos a campo. Para la caracterización del suelo se dividió el establecimiento en tres áreas uniformes, dentro de cada una se tomaron 20 muestras distribuidas al azar de los primeros 20 cm empleando un barreno, por último se agruparon formando tres muestras compuestas. Además, para la realización del ensayo se tomaron en cada sitio aproximadamente 4 kg de suelo de los primeros 20 cm con una pala. Se llevó al laboratorio y se secó al aire, luego se lo tamizó utilizando una malla de 2 mm para remover raíces, piedras y pequeños invertebrados. El suelo se conservó en oscuridad a 5 °C hasta el momento de su análisis.

3.2.2. Diseño del experimento

Se realizó un ensayo bajo condiciones controladas en el que la mínima unidad experimental se denomina microcosmos, en este caso, fueron recipientes de vidrio con tapa de aluminio. Esta metodología es frecuente en estudios de persistencia debido a que las variables microbiológicas y la interacción con los plaguicidas (o en muchos estudios, con hidrocarburos) no requiere de gran superficie ni profundidad para ser estudiada (Nocentini, Pinelli y Fava 2000; Tejada et al. 2011; Pimmata et al. 2013; Álvarez et al. 2013; Sagarkar et al. 2013). El beneficio de trabajar a esta escala es que permite un diseño con un gran número de unidades experimentales en un espacio reducido y controlado. También reduce los insumos, pero lo más importante es que minimiza los residuos peligrosos resultantes de la investigación como solventes de extracción y plaguicidas organoclorados y organofosforados.

Para alcanzar el primer objetivo específico se buscó observar la disipación de los plaguicidas en suelo de huerta convencional y compararla con la disipación en el mismo

suelo esterilizado (de aquí en adelante SHE). El ensayo se diseñó de modo de tener siete tiempos de observación; el inicial (t_0) fue a las 4 horas de aplicados y los otros a los 3, 7, 15, 30, 60, 120 días. Las observaciones fueron más frecuentes al inicio para poder registrar con mayor precisión los cambios iniciales en la concentración de plaguicida. Para cada tiempo de observación el muestreo fue destructivo y se trabajó por triplicado.

Para comenzar se pesaron 100 g de suelo en recipientes individuales de vidrio. Aquellos correspondientes al tratamiento SHE se llevaron a autoclave durante una hora por tres días consecutivos, en cuyos intervalos se los dejó cerrados en sus recipientes a temperatura ambiente. Luego, bajo condiciones de esterilidad (imagen 3.2), se le aplicó a cada frasco la misma dosis inicial de una solución acuosa de clorpirifos y endosulfán.



Imagen 3.2: Campana de flujo laminar para la aplicación de plaguicidas del suelo SHE

Se trabajó con los productos comerciales y la dosis recomendada por su fabricante como se describe en el cuadro 3.1.

Cuadro 3.1: Plaguicidas aplicados en el ensayo y sus dosis

| Principio activo | Endosulfán | Clorpirifos |
|--|---|--|
| Nomenclatura química | hexacloro-endometileno-biciclohepteno-bis(oximetileno)sulfito | <i>O,O</i> -dietil-0-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato, |
| CAS RN | 115-29-7 | 2921-88-2 |
| Formulado comercial | Thionex® 35%p/v, Makhteshim | Lorsban® 48%p/v, Dow AgroSciences |
| Dosis máx. recomendada (L/ha) | 3 | 5 |
| Concentración inicial en microcosmos (mg/kg) | 0,315 | 0,72 |

Todos los frascos se incubaron en oscuridad a 25 °C y se mantuvieron con una humedad del 40-60% de su capacidad de campo, que es un valor consensuado como óptimo para el desarrollo de los microorganismos (Margesin y Schinner 2005), con agua destilada y esterilizada.

Para comparar el comportamiento de los plaguicidas en suelos con diferente historia de uso, se incubó suelo de los tres sitios mencionados: SH (suelo hortícola de producción convencional), SA (suelo hortícola de producción orgánica) y SR (suelo de referencia) a los cuales se les aplicó la misma dosis de plaguicidas (cuadro 3.1). Previo al ensayo, los suelos estuvieron a temperatura ambiente y 15% humedad a modo de pre-incubación. El diseño fue similar, pero se le agregó un tiempo de observación previo a la aplicación para evaluar el impacto de estos plaguicidas sobre la actividad microbiana. Las condiciones de incubación fueron oscuridad a 25 °C y se mantuvieron con una humedad del 40-60% de su capacidad de campo con agua destilada. El ensayo fue destructivo y en cada fecha de observación se

homogenizó el contenido total de cada frasco y por cuarteo se llegó a una submuestra de $4 \pm 0,03$ g para el estudio de plaguicidas, una submuestra de 40 g para respiración basal a realizar ese mismo día y el resto se lo conservó a -20°C para futuros análisis bioquímicos y como contramuestra.

3.2.3 Análisis de plaguicidas

Todos los análisis se realizaron por CG-EDC, la extracción y el método de detección se describió en el capítulo 2, inciso 2.2.3. La concentración de endosulfán total se obtuvo como la suma de áreas de los picos de cada isómero (Fig.3.2). Las curvas de calibrado se encuentran en la sección Material Suplementario B.

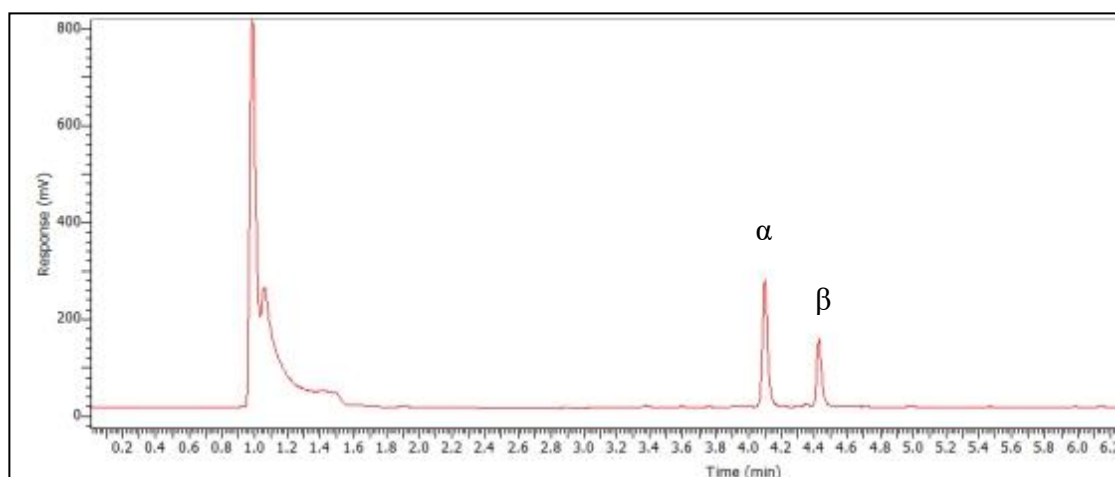


Fig.3.2: Cromatograma del punto 0,5 ppm de la curva de calibrado. Ambos picos bien definidos corresponden a los isómeros α y β del endosulfán.

La identidad de endosulfán sulfato en muestras de suelo del ensayo se confirmó mediante CG-MS comparándolo con espectros de la biblioteca del NIST, según lo descrito en el inciso 2.2.3.3

3.2.4 Análisis fisicoquímicos del suelo

Utilizando protocolos estandarizados (Sparks et al. 1996), se determinó el carbono orgánico total (micro Walkley-Black). El contenido de nitrógeno total Kjeldahl se cuantificó

según ISO 11261 (1995), pH 1:2,5 en agua destilada, p/p con pH-metro Lamotte Tracer®-1766, la conductividad eléctrica con conductímetro Lamotte Tracer®-1766, la capacidad de intercambio catiónico por desplazamiento con cloruro de bario y la cuantificación de cationes intercambiables por absorción atómica y/o fotometría según cada caso. Los contenidos K, Ca y Mg mediante extracción con AcNH_4 1 N a pH 7 y cuantificación por absorción atómica o fotometría de llama.

3.2.4.1 Contenido de humedad y capacidad de campo (CC)

Cuando se realizan experimentos de biodegradación la humedad del suelo es un factor importante. El rango óptimo es 40-60% de la CC (Margesin y Schinner 2005) y para poder ajustar esos valores primero se necesita conocer la CC considerada como la humedad retenida por un perfil de suelo luego de saturación.

En primer lugar, la humedad del suelo se midió por diferencia de peso entre una muestra de suelo secada al aire y la misma muestra secada en estufa a 105 °C durante 24 h. Finalmente se calculó el porcentaje de humedad.

Para conocer la CC, se siguió la metodología según Margesin y Schinner (2005). Se utilizaron recipientes cilíndricos de aluminio con la base perforada y revestida con papel de filtro. Se pesaron (*Prec*) y luego se llenaron los cilindros con suelo fresco hasta 3 cm por debajo del borde, y se colocaron en una bandeja con agua de modo que el nivel de agua coincidiera con la superficie del suelo. Se dejaron así durante 12 horas y luego se colocaron los cilindros tapados con film en una gradilla para su drenaje. Una vez que su peso fue constante, es decir cuando dejó de drenar, se pesó el total del cilindro saturado (*Psat*) y se lo seco en estufa a 105 °C durante 24 h. Al día siguiente se pesaron los cilindros con suelo seco (*Pseco*). El cálculo del porcentaje de CC se realizó según la ecuación 3.1:

Ecuación 3.1:
$$CC\% = \frac{Psat - Pseco}{Pseco - Prec} \times 100$$

3.2.4.2 Textura

El análisis textural se realizó por el método de Bouyoucos que se basa en la determinación de la densidad de la solución de sedimentación por un hidrómetro calibrado y que mide directamente el contenido en porcentaje de la fracción de un determinado diámetro. Se pesaron 50 g de suelo secado al aire y se lo saturó con una solución de peróxido de hidrógeno 30% con el objetivo de destruir la materia orgánica y hacer más precisa la determinación. Se dejó estabilizar la mezcla por 24 horas y se volvió a agregar la solución de peróxido de hidrógeno las veces necesarias hasta que la reacción se detuviera. Luego del secado de la muestra en estufa se agregó la solución dispersante (1 L de agua destilada, 40 g de hexametáfosfato, 10 g de carbonato de sodio) cubriendo el suelo y agitando bien con una varilla. Luego de 24 h se pasó la suspensión a una probeta de litro y se llevó a volumen con agua destilada (imagen 3.3a). La primera medición se realizó introduciendo el hidrómetro (imagen 3.3b) 40 segundos después de homogenizar enérgicamente la suspensión con un émbolo. La segunda medición se realizó 5 horas después sin homogenizar la suspensión. Se tomó nota de la hora, la lectura y la temperatura. Las mediciones se realizaron por duplicado y además se preparó un blanco con solución dispersante y agua. Los cálculos de las fracciones se realizaron con las ecuaciones 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5:

Ecuación 3.2)
$$\% (limo + arcilla) = 100 \times \left(\frac{X}{Y}\right)$$

Dónde:

X= lectura a los 40 s (g/L)

Y= peso de la muestra (g)

Ecuación 3.3)
$$\% arena = 100 - \% (limo + arcilla)$$

Ecuación 3.4)
$$\% \text{ arcilla} = 100 \times \left(\frac{X'}{Y} \right)$$

Donde:

$$X' = \frac{\text{lectura a las 5 horas} \times 100}{Y}$$

Ecuación 3.5)
$$\% \text{ limo} = 100 - (\% \text{ arena} + \% \text{ arcilla})$$



Imagen 3.3: a) (izq) Suelo en suspensión previo a la medición. b) (der): Medición con hidrómetro

3.2.5 Variables bioquímicas

3.2.5.1 Respiración microbiana

Dado que la respiración es el proceso metabólico a partir del cual los organismos aeróbicos oxidan la materia orgánica para obtener energía, su medición puede ser utilizada como un estimador de la actividad global de las comunidades microbianas presentes en el suelo. La respiración basal microbiana (RB) se realizó según la metodología propuesta por Anderson (1982 modificado); se determinó incubando 25 g de suelo y usando una trampa de álcali (NaOH 0,1M) con tres gotas de fenolftaleína en frascos cerrados herméticamente como se muestra en la imagen 3.4. Además, se incluyeron tres blancos de medición que no llevaban suelo. Transcurridas 24 horas, se tituló la solución contenida en el vaso con una solución HCl

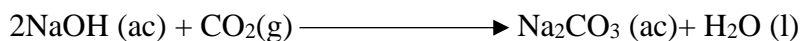
0,1 M con una bureta digital Jencons Digitrate® hasta el viraje de la fenolftaleína. Luego, se agregó el indicador naranja de metilo y se continuó titulando hasta el viraje de este indicador. La diferencia de volumen entre el viraje de la fenolftaleína y el del naranja de metilo corresponde a la cantidad de CO_2 disuelta en el NaOH. Previo a su uso, las soluciones stock de NaOH y HCl fueron valoradas con biftalato de potasio la primera, y por con NaOH valorado la segunda.



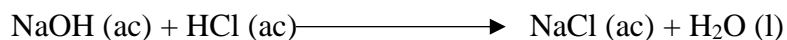
Imagen 3.4: Preparación de cámaras para medir respiración basal: 25 g de suelo fresco, trampa álcali NaOH 0,1 M con fenolftaleína.

Durante 24 h de incubación el dióxido de carbono generado fue atrapado por el NaOH según ec. 3.5. Luego, se tituló la solución con HCl según la reacción de la ec. 3.6 y 3.7, en este caso se neutraliza el NaOH sin reaccionar y el CO_3^{2-} se transforma hasta HCO_3^- . Finalmente, se agregó naranja de metilo y se continuó titulando hasta transformar el HCO_3^- en CO_2 . La diferencia de volumen utilizado en titular hasta viraje de la fenolftaleína y naranja de metilo llevaron al cálculo de la cantidad de dióxido de carbono generado por respiración de los microorganismos (ec. 3.9).

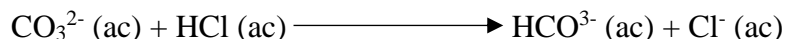
Ecuación 3.5: se atrapa el CO_2



Ecuación 3.6: se titula a la fenolftaleína



Ecuación 3.7:



Ecuación 3.8: se titula al naranja de metilo



Ecuación 3.9:

$$n\text{CO}_2 = [\text{Vol HCl (naranja de metilo)} - \text{Vol HCl (fenolftaleína)}] \times \text{Conc HCl}$$

$$m\text{CO}_2 = n\text{CO}_2 \times \text{MRCO}_2 = n\text{CO}_2 \times 44\text{g/mol}$$

3.2.5.2 Carbono de la biomasa microbiana

Se calculó el carbono de la biomasa microbiana (CBM) según el método de fumigación-extracción (Vance et al. 1987). El principio del método es la muerte y lisis de células microbianas por fumigación con cloroformo, seguida de la extracción y cuantificación del carbono orgánico (CO) liberado. Para su determinación se pesaron 7,5 g de suelo seco por duplicado en tubos cónicos de 50 mL. Se agregaron 2,5 mL de agua destilada y se dejaron incubando durante 15 horas a 30 °C en la oscuridad. Posteriormente una repetición por muestra fue fumigada con 0,4 mL de cloroformo, dejándola reposar por 30 minutos. Luego se adicionaron 30 mL de sulfato de potasio 0,5 M a todas las muestras y se agitaron durante 1 hora en posición horizontal. Se filtraron y se transfirieron 4 mL de extracto a tubos de ensayos. A las mismas se le agregaron 1 mL de dicromato de potasio 0,06667 M y 4 mL ácido sulfúrico concentrado. Se pasaron las mezclas por un vórtex para

homogeneizar e inmediatamente se digirieron a 140 °C durante 30 minutos. Posteriormente se les agregó 1 mL de agua destilada y se dejaron entibiar. Finalmente se midieron colorimétricamente en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm, comparándolo con una curva de calibración. El contenido de CBM se obtuvo de la diferencia entre el CO extraído de muestras fumigadas y no fumigadas.

3.2.5.3 Actividad Enzimática deshidrogenasa

Las enzimas deshidrogenasas pertenecen al grupo de las oxidorreductasas que se encargan de eliminar átomos de hidrógeno de la molécula del sustrato y transferirlos a un cofactor o coenzima (como algunas vitaminas o los nucleótidos NAD, NADP, FAD y FMN) que es reducido al recibir dichos átomos (Margesin y Schinner 2005).

Las deshidrogenasas están presentes en todos los seres vivos, en particular en levaduras y bacterias, son en su mayoría intracelulares y son claves en el metabolismo energético de las células. Por eso, la actividad deshidrogenasa en suelo refleja un amplio espectro de actividades oxidativas y puede ser tomado como una medida de la intensidad del metabolismo de la microbiota edáfica en un determinado momento (Rossel et al. 1997; García y Hernández 2000; Margesin y Schinner 2005).

Para realizar esta determinación se siguió la metodología en Alef (1995) modificando el volumen de acetona. Las muestras de suelo fresco se incubaron en presencia de un aceptor de electrones artificial, el trifenil-tetrazolio (TTC), y se cuantificó su producto de reducción, el trifenil-formazán (TPF), por espectrofotometría.

En tubos de centrifuga se colocaron 5 g de suelo y se les agregó 5 mL de una solución de TTC 1% (en buffer Tris 0,1 M, pH 7,6). El control consistió en 5 g de suelo

únicamente con 5 mL de buffer Tris. Los tubos se agitaron en vórtex y se incubaron en oscuridad a 30°C durante 24 h. Luego de este período, a cada muestra se le agregó 25 mL de acetona y se colocaron en un agitador orbital a 150 rpm durante 2 h protegiéndolo de la luz. Luego de centrifugar por 10 minutos y recuperar el sobrenadante, se midió la absorbancia a 546 nm para determinar la concentración de TPF, producto de la reacción de color rojo. Para ello se realizó una curva de calibración con soluciones de 0-100 µg TPF mL⁻¹ (Material Suplementario C). Por cada tratamiento se incluyó un control sin agregado de sustrato y, a su vez, en cada tanda de medición se incorporaron dos blancos con todas las soluciones correspondientes, pero sin agregado de suelo.

3.2.6 Análisis estadístico

Los datos de plaguicidas se analizaron mediante ajustes a regresiones no-lineales con GraphPad Prism versión 6.01 para Windows (GraphPad Software, CA USA).

Los datos ajustaron a un modelo cinético de primer orden:

$$\text{Ecuación 3.10} \quad (Ct = C0 * e^{-kt})$$

En donde Ct es la concentración del plaguicida a t días post aplicación, $C0$ es la concentración inicial y k es la tasa de degradación (constante), el parámetro que interesa comparar a los fines de esta investigación. Esta función exponencial decreciente permite calcular el tiempo de vida media de estos plaguicidas. La vida media $t_{1/2}$ es el tiempo requerido para que el plaguicida se disipe o se degrade hasta la alcanzar la mitad de su concentración inicial, se calculó como $t_{1/2} = \ln 2/k$ y se expresa en días. Dado que estos compuestos tienden a su descomposición total, se estableció en el modelo la restricción del plateau al valor cero.

Para comparar parámetros y para aquellas excepciones en las que los datos fueron ambiguos, con el mismo programa se realizaron pruebas de F para comparar modelos anidados con un nivel de significancia de $p < 0,05$ (Motulsky y Christopoulos 2003).

Los resultados se informan empleando la variable “% de recuperación relativa” que se obtiene de calcular:

$$\text{Ec. 3.11} \quad \% \text{Recup.} = (\text{Concentracion}_t / \text{Concentracion}_{\text{inicial}}) * 100$$

Los datos de variables bioquímicas se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y el test de comparaciones múltiples LSD de Fisher, con el programa Infostat (Di Rienzo et al. 2014).

3.3 Resultados

3.3.1 Suelo

Las características físicas y químicas del suelo utilizado en el ensayo se muestran en el cuadro 3.2.

Cuadro 3.2: Características fisicoquímicas del suelo empleado en el experimento.

| Parámetros | Suelo | | |
|-----------------|-------|-------|-------|
| | SH | SA | SR |
| CIC (meq/100gr) | 16,8 | 19,9 | 11,53 |
| CI (meq/100gr) | 11,89 | 15,45 | 5,94 |
| Mg | 3,1 | 2,37 | 2,02 |
| K | 2,67 | 1,08 | 1,12 |
| Na | 0,79 | 0,91 | 0,38 |
| PSI (%) | 4,7 | 4,6 | 4,25 |
| pH | 6,8 | 7,78 | 6,52 |
| COT | 2,04 | 1,35 | 3,00 |
| N total (%) | 0,23 | 0,13 | 0,19 |
| CC (%) | 59,85 | 63,61 | 65,83 |
| Textura (%) | | | |
| Arena | 33 | 29 | 17,33 |
| Limo | 46,64 | 30,64 | 58,50 |
| Arcilla | 20,36 | 40,36 | 24,17 |
| Clase Textural | F | A | FL |

CIC: Capacidad de intercambio catiónico; CI: Cationes intercambiables; PSI: porcentaje de sodio intercambiable; COT: carbono orgánico total; CC: capacidad de campo; F: franco; A: arcilloso; FL: franco limoso

3.3.2 Plaguicidas

Para responder al primer objetivo, se obtuvieron curvas de disipación para los tratamientos Suelo de Huerta (SH) y Suelo de Huerta Estéril (SHE). En la figura 3.3 se observó como en SHE los insecticidas mantuvieron el % de recuperación a lo largo del experimento, en el caso del clorpirifos la vida media fue de 667 días pero el endosulfán tuvo una constante de degradación k cercana o igual a cero. Estos resultados se complementan con la detección de endosulfán sulfato en SH pero nunca en SHE.

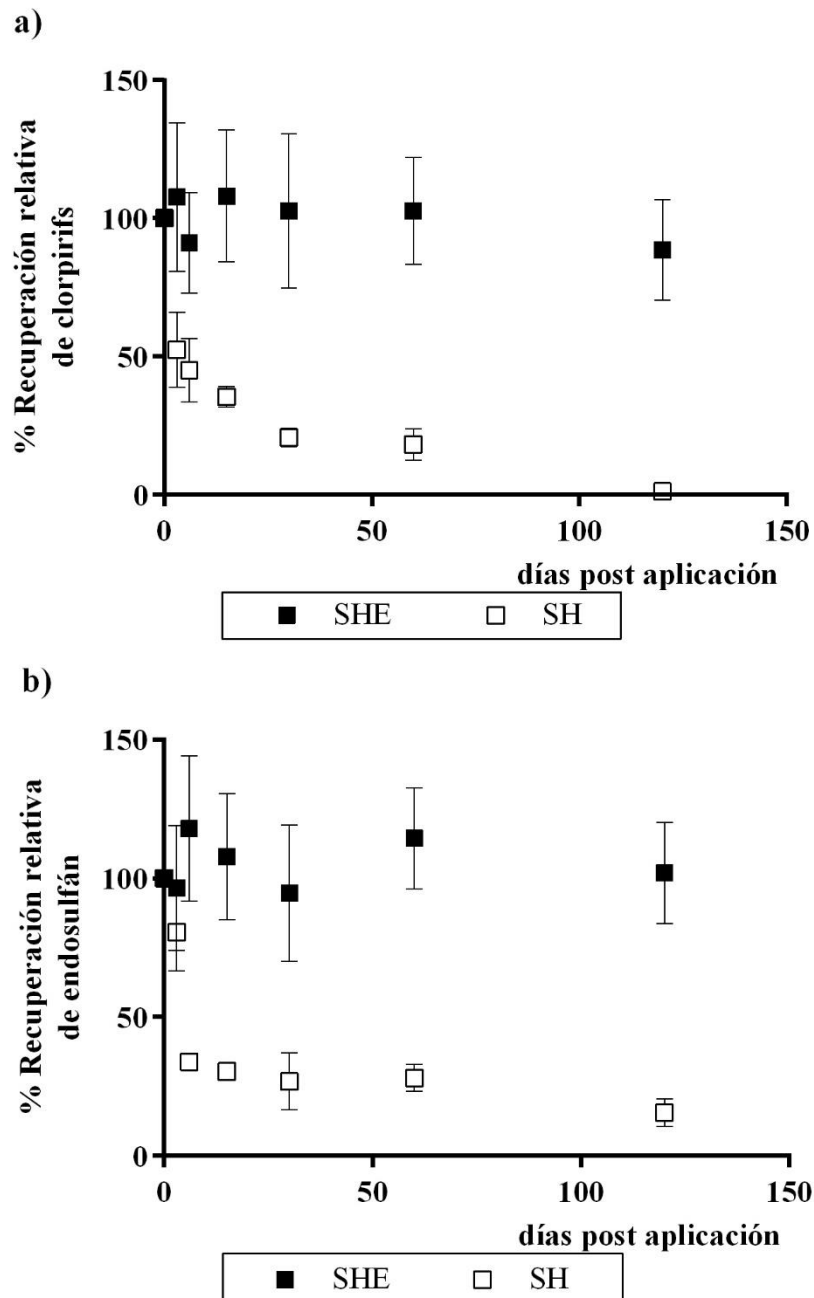


Fig.3.3: a) Curvas de degradación de clorpirifos. b) Curvas de degradación de endosulfán. Cantidades de endosulfán recuperado al tiempo 0 se tomaron como el 100%. Se grafican las medias de 3 observaciones y las barras de desvío estándar (desv.est). SHE: suelo de huerta esterilizado, SH: suelo de huerta

Para alcanzar el segundo objetivo, se obtuvieron curvas de degradación de ambos plaguicidas para los suelos con distinta historia de uso.

3.3.2.1 Clorpirifos

Se obtuvieron las curvas de degradación y los datos cinéticos (cuadro 3.3), los cálculos de vida media ordenaron a los tres suelos de la siguiente manera: SH (9,8) > SA (7,8) > SR (7,3).

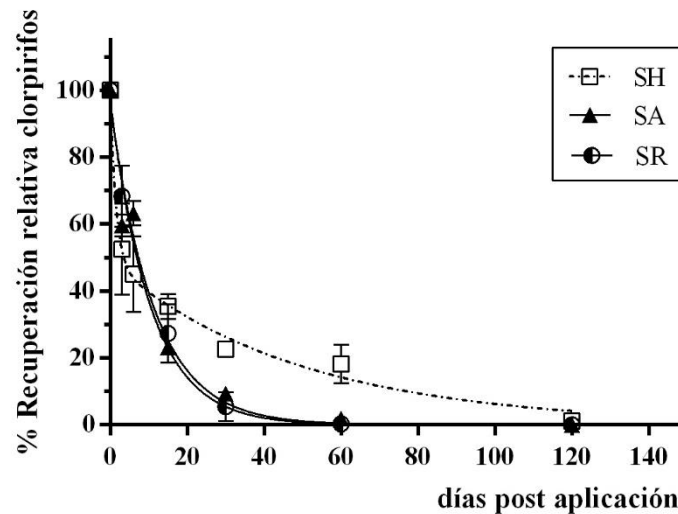


Fig. 3.4: Curvas de degradación de clorpirifos. Cantidades de endosulfán recuperado al tiempo 0 se tomaron como el 100%. Se grafican las medias de 3 observaciones \pm desv.est. y la función de ajuste exponencial decreciente para todos los tratamientos. SH: Suelo hortícola convencional; SA: suelo hortícola de producción orgánica; SR: suelo de referencia.

Los ajustes tuvieron valores de R^2 igualmente elevados (mayores a 0,7) sin embargo se puede observar gráficamente en la figura 3.4, como en SH el clorpirifos tiene una degradación inicial rápida y luego una lenta. Por eso se evaluó si un modelo exponencial decreciente bifásico (o bi-exponencial), sería más representativo y mediante una prueba de F se concluyó que sí.

Cuadro 3.3: Datos cinéticos de clorpirifos en tres suelos experimentales, $t_{1/2}$ es la vida media expresada en días con su intervalo de confianza (IC95%), y k la constante de degradación. Dentro de una fila, vidas medias con una letra distinta son significativamente

| | SH | SA | SR |
|----------------------------------|---------------|-------------|-------------|
| Clorpirifos | | | |
| Decaimiento exponencial | | | |
| R^2 adj | 0,78 | 0,97 | 0,98 |
| $t_{1/2}$ | 9,82a | 7,8a | 7,23a |
| IC 95% de $t_{1/2}$ | 6,62 - 19 | 6,49 - 9,78 | 6,08 - 8,92 |
| k | 0,07 | 0,08 | 0,09 |
| Decaimiento exponencial bifásico | | | |
| R^2 adj | 0,95 | - | - |
| $t_{1/2}$ (lenta) | 33,89 | | |
| IC 95% $t_{1/2}$ lenta | 22,52 - 68,42 | | |
| $t_{1/2}$ (rápida) | 1,04 | | |
| IC 95% $t_{1/2}$ rap | 0,53 - 41,71 | | |
| k rápida | 0,66 | | |
| k lenta | 0,02 | | |

3.3.2.2 Endosulfán

Los datos ajustaron a un modelo exponencial decreciente de primer orden. Al igual que el clorpirifos se estableció en el modelo una restricción de *plateau* igual a cero. Como se observa en la figura 3.5 la función de ajuste no pasa por todos los puntos, pero modelar el *plateau* en este tipo de experimento resultaría en una subestimación de la vida media y una sobreestimación de la tasa k de degradación, por lo que se asume que el porcentaje de recuperación tiende a cero en el tiempo. Aun así, los resultados de este experimento demuestran que a los 30, 60 y 120 días el endosulfán persiste entre 30-15% de la dosis inicial.

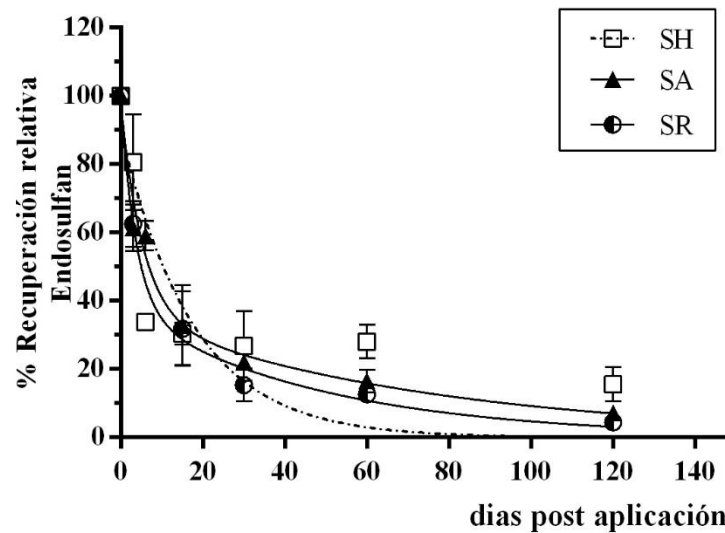


Fig. 3.5: Curvas de degradación de endosulfán. Cantidades de endosulfán recuperado al tiempo 0 se tomaron como el 100%. Se grafican las medias de tres observaciones y la función de ajuste exponencial decreciente para todos los tratamientos. SH: Suelo hortícola convencional; SA: suelo hortícola de producción orgánica; SR: suelo de referencia

El cálculo de vida media vuelve a ordenar a los tres suelos en la misma tendencia que para clorpirifos: SH (12,2) > SA (10,7) > SR (9,7) (cuadro 3.4). Aun así, se puede distinguir como a los 60 y 120 días se degradó más en SA y SR que en SH.

Cuadro 3.4: Datos cinéticos de endosulfán total y sus isómeros en tres suelos experimentales, $t_{1/2}$ es la vida media expresada en días con su intervalo de confianza (IC95%), y k la constante de degradación. Dentro de una fila, y para el mismo isómero, vidas medias con una letra distinta son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). SH: Suelo hortícola convencional, SA: suelo hortícola de producción orgánica y SR: suelo de referencia de uso recreativo

| | SH | | | SA | | | SR | | |
|---------------------|----------------|---------------|-----------------|----------------|--------------|-----------------|----------------|---------------|--------------|
| Endosulfán | Σ total | α - | β - | Σ Total | α - | β - | Σ Total | α - | β - |
| R^2 adj | 0,68 | 0,88 | 0,38 | 0,89 | 0,96 | 0,75 | 0,93 | 0,95 | 0,93 |
| k | 0,05 | 0,10 | 0,00 | 0,06 | 0,15 | 0,01 | 0,07 | 0,15 | 0,03 |
| $t_{1/2}$ | 12,24 | 6,61a | 102,1a | 10,76 | 4,68a | 49,10a | 9,74 | 4,57a | 25,78b |
| IC 95% de $t_{1/2}$ | 7,7- 29,8 | 4,82- 10,5 | 60,03- 340,9 | 8,1- 16,1 | 3,93- 5,7 | 34,91- 82,71 | 7,5- 14 | 3,49- 6,61 | 20,77- 34 |

Se analizó la cinética de los isómeros de endosulfán por separado y las curvas se muestran en la figura 3.6. Allí se puede ver como el isómero α tiene un comportamiento similar en los tres suelos, pero es en la cinética del β -endosulfán en donde se observan diferencias. Las vidas medias quedan ordenadas de la siguiente manera SH (102 días) > SA (49) > SR (25).

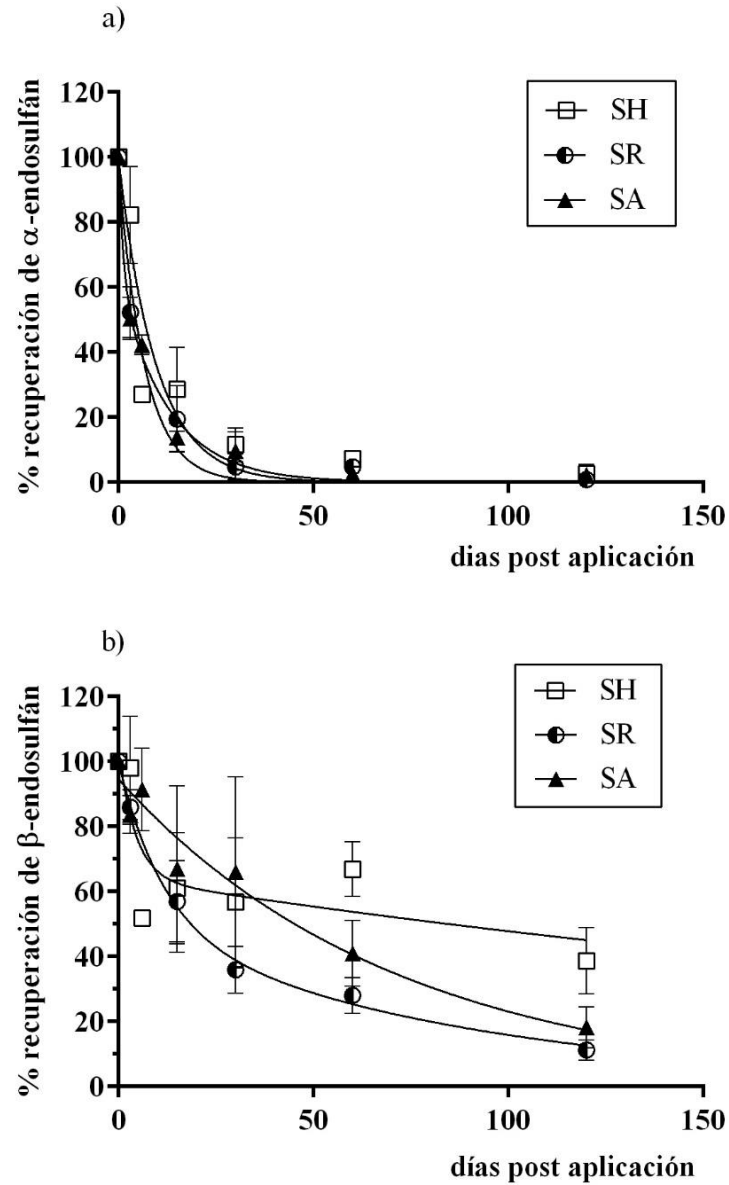


Fig. 3.6: A) Curva de degradación de α -endosulfán en los tres tipos de suelo y su función de ajuste. B) Curva de degradación para el β -endosulfán. Los puntos graficados representan la media de tres valores y las barras su desvío estándar. SH: Suelo hortícola convencional, SA: suelo hortícola de producción orgánica y SR: suelo de referencia de uso recreativo

3.3.2.3 Endosulfán sulfato

En cuanto a los productos de degradación, los resultados obtenidos por CG-ECD mostraron la aparición de un pico a los 4,65 min que no se encontraba en los cromatogramas de suelo previos a la aplicación. Luego de concentrar y analizar las muestras con GC-MS en

modo barrido completo (scan), se confirmó mediante selección de iones característicos que el pico correspondía al endosulfán sulfato (ES) en todos los casos en los que se lo observó, siendo el único metabolito detectado (figura 3.7).

El ES se detectó en todos los tratamientos excepto en suelo estéril, por lo que se confirma que es un subproducto de la degradación microbiana que no estaba presente en el formulado comercial ni se obtiene por hidrólisis.

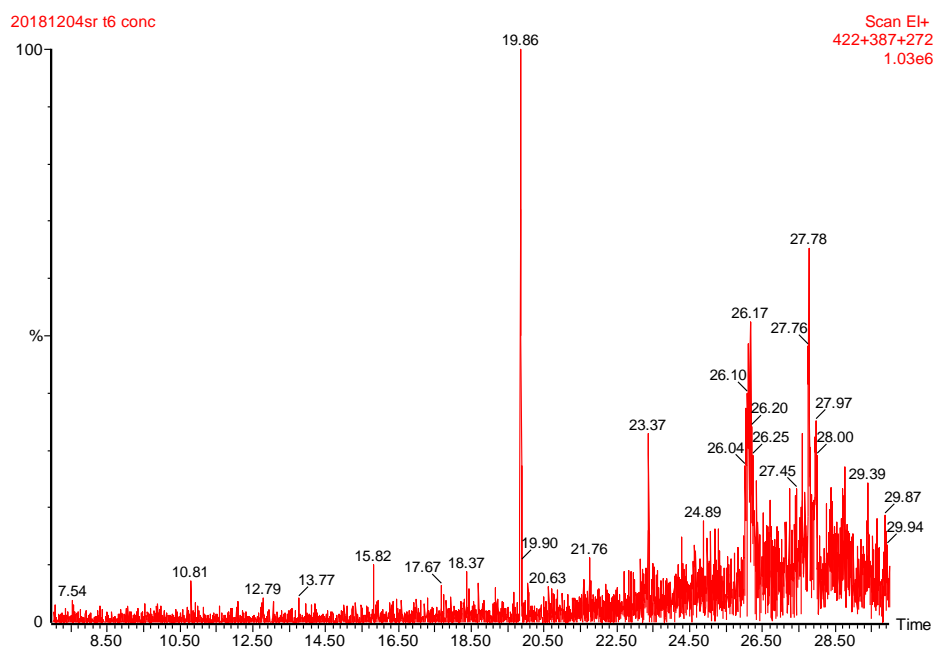


Fig. 3.7: Cromatograma de los iones característicos (m/z 422, 387 y 272) de la muestra de SR a los 120 días post aplicación. El pico más visible con tiempo de retención 19,86 minutos, pertenece a endosulfán sulfato (ES).

A continuación, se presenta la evolución de ES para cada suelo (figura 3.8). Las cantidades de ES formado aumentaron hasta el día 7 y luego se observó una lenta degradación. Entre los suelos se observaron diferencias en la cantidad generada, siendo SR el suelo en donde más se acumuló inicialmente, luego SA y por último SH.

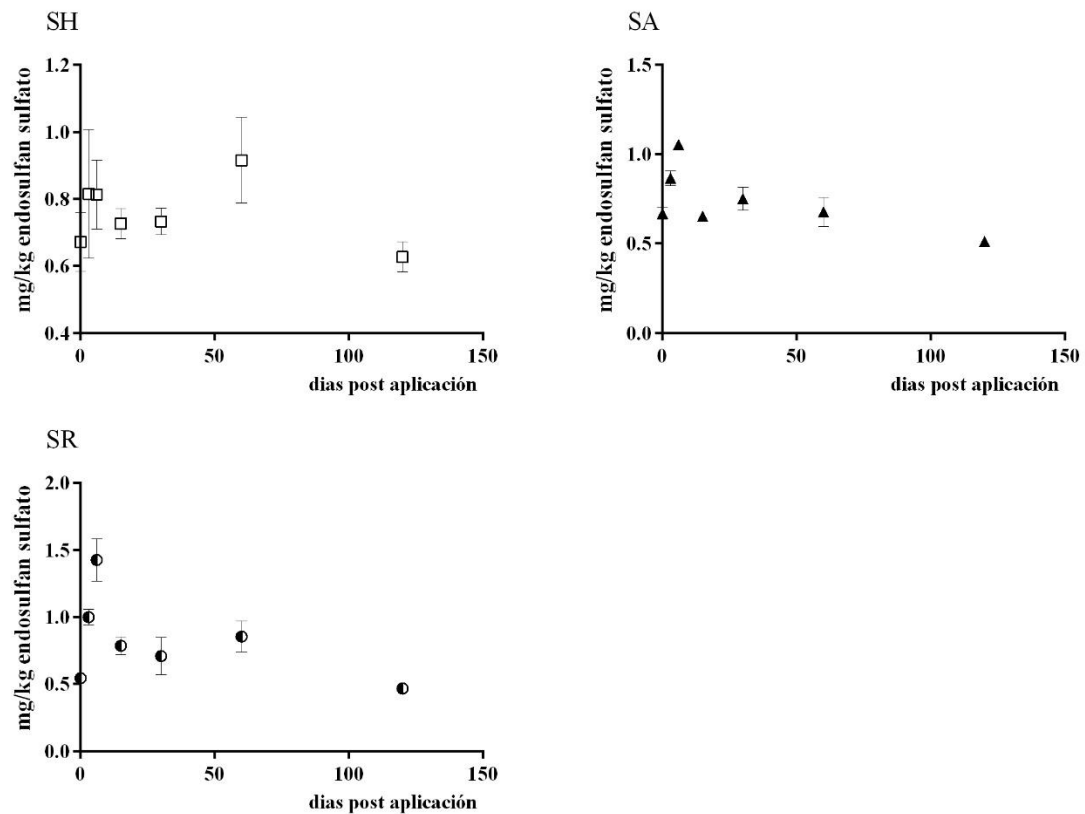


Fig. 3.8: Evolución de endosulfán sulfato en los tres suelos. Los puntos representan medias con su desvío estándar (n=3)

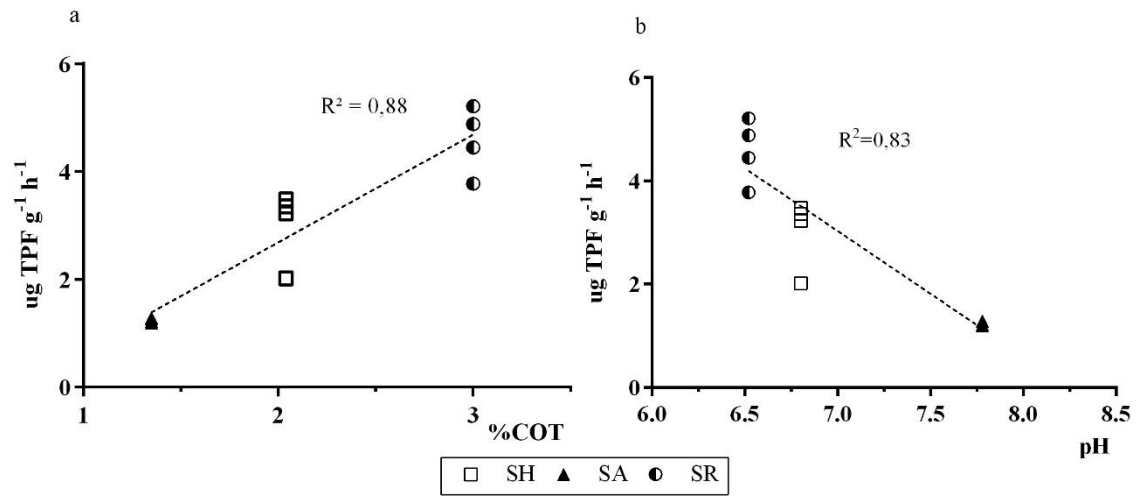
Para comparar esta degradación entre suelos, se calcularon porcentajes de recuperación y se ajustó a una regresión no-lineal, tomando como C_0 aquella concentración máxima del día 7 en el que más se acumuló ES. El resultado de vidas medias fue de 70,5 días en SA y 44,9 días SR pero dado que estadísticamente los describe una única función, la vida media resultante para ambos fue 56,2 días. En SH los datos no tuvieron ajuste a una función exponencial decreciente.

3.3.3 Variables bioquímicas

En cuanto a las variables bioquímicas medidas, la respiración basal (RB) presentó interacción significativa entre factores con lo cual se presentan los resultados de las comparaciones entre suelos para cada fecha. En general, salvo para una fecha, la RB fue

mayor en SH que en SR, y SA tuvo valores intermedios. En el cuadro 3.5 se presentan los resultados para cada fecha de observación. SH fue el único tratamiento donde se observó disminución de la respiración luego de la aplicación de los plaguicidas y luego de tres días se recuperó volviendo a su valor inicial. Estas mayores tasas de respiración inicial (0, 3 y 7 días) coinciden con el periodo de mayor biodegradación de los plaguicidas.

La actividad deshidrogenasa presentó diferencias ($p < 0,0001$) según el tipo de suelo quedando ordenados de la siguiente manera: $SR > SH > SA$ (LSD Fischer: $p < 0,05$). SH fue el único tratamiento en donde se observó un aumento posterior a la aplicación y luego no varió en las siguientes fechas de observación. Tanto en SR como en SA los niveles de actividad no variaron respecto a la situación sin contaminar. Según la literatura (Wolińska y Stępniewska 2012), el pH y el %COT son factores que afectan la ADH en suelo por lo que se buscó relacionar estas variables obteniendo correlaciones de $R^2=0,83$ y $R^2=0,88$ respectivamente (Figura 3.5).



Cuadro 3.5: Evolución de la respiración basal microbiana (RB), actividad enzimática deshidrogenasa (ADH) y carbono de la biomasa microbiana (CBM). Los valores representan las medias (n=3) y el desvío estándar. La columna -1 corresponde al momento previo a la aplicación de los plaguicidas. Dentro de una misma columna, medias con la misma letra(s) no son significativamente distintas (Tukey test, $p < 0,05$). TPF: trifenílformazan; SH: Suelo hortícola convencional, SA: suelo hortícola de producción orgánica y SR: suelo de referencia de uso recreativo

| Días | -1 | 0 | 3 | 7 | 15 | 30 | 60 | 120 |
|---|------------|------------|------------|---------------|------------|------------|---------------|------------|
| RB (mg CO ₂ g ⁻¹) | | | | | | | | |
| SH | 0,77a±0,03 | 0,62a±0,13 | 0,81a±0,03 | 0,47a±0,03 | 0,29a±0,09 | 0,52a±0,07 | 0,47a±0,08 | 0,38a±0,08 |
| SA | 0,56b±0,05 | 0,50ab±0,1 | 0,38b±0,04 | 0,38ab±0,03 | 0,29a±0,01 | 0,33b±0,0 | 0,22b±0,11 | 0,41a±0,13 |
| SR | 0,38c±0,08 | 0,40b±0,03 | 0,48b±0,04 | 0,25b±0,01 | 0,26a±0,03 | 0,29b±0,05 | 0,24b±0,04 | 0,11b±0,03 |
| ADH (µg TPF g ⁻¹ h ⁻¹) | | | | | | | | |
| SH | 2,02b±0,0 | 3,22b±0,36 | 3,48b±0,37 | | | | | 3,36a±0,89 |
| SA | 1,19c±0,16 | 1,29c±0,25 | 1,22c±0,51 | | | | | 1,28b0,38 |
| SR | 4,88a±0,38 | 4,45a±0,54 | 5,21a±1,38 | | | | | 3,78a±0,88 |
| CBM (µg C g ⁻¹) | | | | | | | | |
| SH | | | | 193a±38,1 | | | 223,5a±74,24 | |
| SA | | | | 87,66b±15,01 | | | 13b ±0,0 | |
| SR | | | | 164,5ab±27,58 | | | 197,67a±60,12 | |

3.4 Discusión

El destino de los plaguicidas en el ambiente y particularmente en el suelo, depende de múltiples factores. Los resultados del ensayo con suelos esterilizados, en concordancia con Getzin (1981) y Parkpian et al. (1998) sugieren que la actividad microbiana es la principal responsable de la disipación de estos plaguicidas (es decir, la no detección en suelo analizado), ya que por un lado, los % de recuperación en SHE fueron prácticamente constantes durante 120 días, y que en esos suelos no se detectó el metabolito endosulfán sulfato y sí se lo encontró en los suelos no esterilizados. Como se mencionó en la introducción de esta tesis el suelo es una matriz compleja y heterogénea en la cual los compuestos orgánicos son adsorbidos, con mayor o menor fuerza, de manera reversible o irreversible. En este sentido, cabe la posibilidad de que entre el momento de aplicación y el primer muestreo a las 4 horas (considerado luego C0), una fracción de las moléculas en solución hayan quedado retenidas sobre partículas del suelo y esto no se vea reflejado en los resultados de la figura 3.3. De todos modos, se considera que la participación de procesos de sorción irreversibles y de transformaciones abióticas fue mínima, dado que de otro modo se hubiera recuperado cada vez menos endosulfán durante el ensayo (Koskinen y Harper 1990). En el caso de clorpirifos, sí es posible que haya sufrido una lenta transformación abiótica, aunque al compararla con la biótica se vuelve despreciable (vida media en SHE 667 días comparada con vida media en SH 9,8 días). Como muestra la bibliografía especializada los procesos de retención (y/o transporte) juegan un papel importante en el destino y persistencia de los plaguicidas, sin embargo el estudio en profundidad de estos mecanismos excede a los objetivos de esta tesis, y con los resultados expuestos, se decidió enfocar el estudio sobre la

transformación biótica y las formas de mejorar o intensificarla con el propósito de descontaminar.

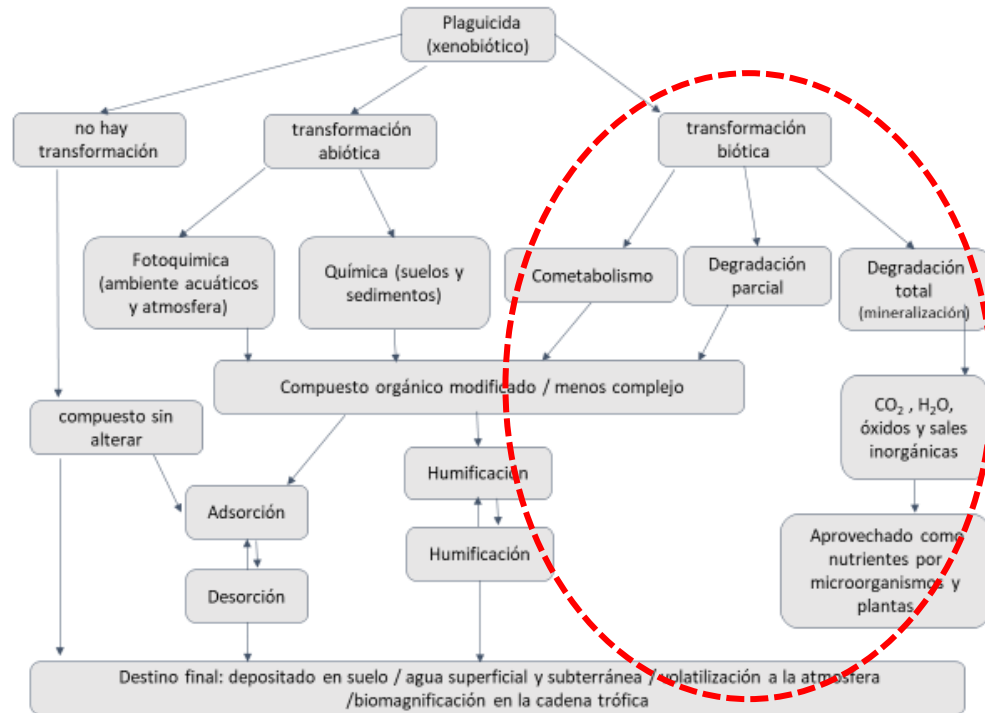


Fig. 3.10: Esquema de los destinos posibles de un plaguicida en el ambiente. Tomado y traducido de Verma et al. (2014)

Los resultados de este ensayo se consideran valiosos en términos de la información que aportan sobre suelos locales, dado que al evaluar la bibliografía especializada, no existe un verdadero consenso sobre cuáles son y cuándo operan los procesos de retención y transformación biótica y abiótica sobre endosulfán y clorpirifos. Si bien lo esperable es una gran participación de la acción microbiana en la disipación, las condiciones del suelo también pueden ser determinantes en la persistencia del plaguicida. Para ejemplificar esto, Ben Salem et al. (2019) hallaron en un experimento de microcosmos con suelos de Túnez que la vida media de clorpirifos en suelo estéril fue igual a la del suelo no estéril; de igual modo Tariq et al. (2006) con endosulfán en suelo paquistaní. Por último, Singh et al. (2000) hallaron que

en suelo esteril el endosulfán es mas persistente, pero al comparar distintos tipos de suelo (vertisol, aridisol, alfisol, molisol) esterilizados, las vidas medias variaban, señalando la importancia de la transformación abiótica en esos casos y cómo varían con el tipo de suelo. Esta variabilidad en los resultados, acentúa la relevancia de producir este tipo de datos/información para suelos de la región hortícola bonaerense.

Respecto a la persistencia del clorpirifos, los resultados son consistentes con las vidas medias reportadas en la literatura. Por ejemplo, para suelos de Buenos Aires, Querejeta et al. (2014) informaron una vida media de 16 días para la degradación de clorpirifos en un suelo hortícola tradicional y Álvarez et al. (2013) hallaron vidas medias de 5,7 y 15,1 días según la dosis inicial fuera 6 o 3 mg/kg. Fang et al. (2009) establecieron vidas medias levemente mayores (14,3 días a 18,0 días), con una tendencia a aumentar junto con la dosis inicial de aplicación (de 4 mg/kg a 12 mg/kg). Chu et al. (2008) y Wang et al. (2016) reportaron vidas medias del mismo orden (entre 3,2 días a 7,3 días), mientras que Chai et al. (2013) establecieron vidas medias de 55,3 días a 77,0 días para suelos tropicales húmedos, 49,5 días a 120 días para suelos tropicales secados al aire, y 63,0 días a 124 días para suelos tropicales húmedecidos hasta alcanzar capacidad de campo.

No hubo diferencia entre las vidas medias de los distintos suelos, pero el hecho de que en SH el comportamiento de clorpirifos ajustara a una curva bifásica está dando cuenta de que otro proceso puede estar sucediendo. Esta mayor degradación inicial sugiere que existe una población microbiana adaptada al uso intensivo de plaguicidas y de rápida respuesta y esto se ve respaldado por el aumento de la respiración basal en los primeros días. Otros autores también observaron este comportamiento bifásico de clorpirifos en suelo (Baskaran et al. 1999; Chu et al. 2008; Fang et al. 2006) y Querejeta et al. (2014) observaron que en un

suelo hortícola similar a SH, la degradación de clorpirifos fue significativamente mayor que en un suelo de referencia no productivo también, sugiriendo la respuesta adaptativa como explicación. Sin embargo, esta capacidad degradativa en SH no es constante durante todo el ensayo y al día 30 ya se detecta menos clorpirifos en SA/SR y para el día 60 ya no es detectable. De manera similar sucede con el endosulfán, una misma k describe las tres curvas; en SH se observó una rápida degradación inicial pero a los 60 y 120 días se detecta mayor concentración de plaguicidas en SH que en SA/SR; por lo tanto en este estudio no hay suficiente evidencia para decir que hubo mineralización acelerada.

En cuanto a la persistencia de los isómeros de endosulfán, en todos los casos el α -endosulfán se degradó más rápido que el β -endosulfán. Esto coincide con la mayoría de la literatura (Ghadiri y Rose 2001; Weber et al. 2010; Odukkathil y Vasudevan 2016) pero lo novedoso fue que las vidas medias obtenidas fueron menores que las reportadas por dichos autores. Además, se encontró una diferencia interesante al comparar vidas medias del isómero β entre SH (102,1 d), SA (49,1 días) y SR (25,8 días) (cuadro 3.4), que indica una capacidad inferior de los microorganismos del suelo hortícola tradicional para degradar el β -endosulfán. En un ensayo de incubación de suelos provenientes de suelos hortícolas de producción de tomate y condiciones de humedad y temperatura, Castro et al. (2002) también encontraron valores de vida similares a SH para los isómeros: 12 días α -endosulfán y 98 días para β -endosulfán. En cuanto al metabolito endosulfán sulfato en SH se observó que se generó menos que en SA/SR de lo cual se deduce que la degradación de endosulfán siguió rutas metabólicas no-oxidativas por parte de otros microorganismos presentes (y abundantes) en ese suelo. En un trabajo de Kwon et al. (2002) aislaron 40 cepas bacterianas de suelos impactados con endosulfán, y solo dos degradaron endosulfán sin formar ES (una fue

identificada como *Klebsiella pneumoniae*). En otro experimento de degradación empleando un co-cultivo de cepas de *Bacillus* encontraron porcentajes de degradación mayores a 80%, obteniendo como único metabolito el endosulfán lactona (Awasthi et al. 2003). En nuestro caso, además de observarse menor acumulación de ES en el suelo hortícola convencional también se pudo apreciar que posterior a la acumulación, la degradación fue lenta (fig. 3.8). En todos los casos esta acumulación de ES es problemática (Kataoka y Takagi 2013) y por lo tanto se propone para futuros estudios trabajar sobre la selección de organismos con capacidad de degradarlo.

El comportamiento en SA y en SR, tanto de clorpirifos como de endosulfán es llamativo porque las curvas se superponen completamente, aun teniendo diferencias de más del doble en %COT, perteneciendo a clases texturales diferentes (factores muy influyentes en la persistencia). En ambos la vida media fue baja y comparable con SH a pesar no haber tenido contacto previo con los plaguicidas. Al analizar las variables bioquímicas (respiración y ADH) fue llamativo que si bien se registró degradación de los plaguicidas, estas no aumentaron ni disminuyeron con la aplicación de los mismos ni tampoco se las relacionó con un gradiente de intensidad de uso del suelo como en otros trabajos (Nannipieri 1994; Di Ciocco et al. 2014). Esto genera nuevas preguntas respecto a cuáles son los factores en común que pueda tener un suelo de producción orgánica y un suelo no perturbado. Cuáles son más saludables en términos de capacidad degradativa (o resilientes) y por qué. Para hipotetizar, en este ensayo se tuvieron dos situaciones: un suelo que tiene poblaciones estables listas de rápida respuesta producto de una exposición previa (SH) y otros dos que sostienen una comunidad compleja de microorganismos que le confiere una capacidad metabólica y sobretodo co-metabólica para degradar estos xenobióticos en una etapa posterior (SA/SR).

Para avanzar sobre estas hipótesis sería interesante realizar a futuro análisis de diversidad funcional con el doble objetivo de caracterizar los suelos del ensayo microbiológicamente y a su vez observar cambios en el tiempo de tipo *turn-over* a medida que se degradan los plaguicidas.

3.5 Conclusiones

En este capítulo, la ausencia de descomposición de los plaguicidas en suelo estéril nos permitió concluir que la microbiota del suelo cumple un rol fundamental en la disipación del clorpirifos y el endosulfán en el suelo ensayado. En segundo lugar, el suelo de producción hortícola orgánica y el suelo no productivo de referencia fueron superiores (e iguales entre sí) en cuanto a su capacidad para degradar estos xenobióticos. La diferencia más marcada de éstos con el suelo hortícola convencional fue la capacidad inferior de los microorganismos en este último para degradar β -endosulfán y el comportamiento bifásico encontrado en el caso del clorpirifos. En tercer lugar, bajo estas condiciones experimentales la incubación de los tres suelos resultó en la formación y acumulación de endosulfán sulfato.

PARTE B

3.5 Materiales y Métodos

1.5.1 Suelo

El suelo a partir de la cual se aislaron los microorganismos provino del establecimiento hortícola descrito previamente como SH en la parte A de este capítulo. Se tomó una muestra compuesta al azar, de los primeros 15 cm en un lote productivo. Luego de tamizarlo se lo conservó a 5 °C.

1.5.2 Plaguicida

El endosulfán empleado cuando fue el principio activo (p.a) de Fluka Analytical® pureza 99,4% y cuando fue formulado comercial se utilizó Sufan® 35 (Agroquimicos Versa®, 35%).

1.5.3 Aislamiento

Para el aislamiento se pesaron 25 g de suelo en frascos de vidrio de 1 L, por duplicado. A cada uno se le agregó 200 mL de Medio Mineral (MM) descrito en Material Suplementario D; y una dosis inicial diferente de endosulfán de modo de llegar a una concentración final de 22 (A) y 2000 (B) ppm a partir del formulado comercial. Se mantuvieron en agitación constante y temperatura ambiente por 7 días, momento en el cual se realizó un recambio tomando 50 mL de cada frasco y colocándolos en nuevos frascos de vidrio con MM y endosulfán, y se incubaron por 7 días más. Completados los 15 días, se dejó sedimentar. Se reservaron 50 mL sobrenadantes de cada frasco y se refrigeraron.

Del sobrenadante de los dos frascos A y B se tomó una porción con el asa estéril y se sembraron por estría en placa de agar LB (Luria- Bertani) y en PDA (del inglés *Potato Dextrose Agar*) para favorecer el crecimiento de bacterias en el primer caso, y hongos y levaduras en el segundo caso (métodos en Material Suplementario E). Se incubaron por duplicado a 30 °C y se realizan observaciones a las 24 y 48 h posteriores al sembrado.

Se confirmó la presencia microbiana a las 48 h de incubación (imagen 3.5). Las colonias fueron seleccionadas por su morfología, color y textura. Se realizaron resiembras hasta obtener colonias puras y posteriormente se llevó a cabo tinción Gram a cada una de las colonias con el fin de conocer la forma de las bacterias y si pertenecían al grupo de las Gram positivas o negativas.



Imagen 3.5: Primera siembra del sobrenadante en LB

3.5.4 Pruebas de inhibición en placa

Se sembraron en cajas de Petri aquellas colonias puras identificadas en la etapa anterior. Luego de 2 h de incubación se les colocaron a cada una, cuatro discos de papel filtro embebidos en una solución 50ppm de endosulfán (p.a.) en acetona. El objetivo fue observar crecimiento o inhibición sobre los discos respecto al resto de la caja de Petri. Se realizaron observaciones a las 24 y 48 h.

3.5.5 Aclimatación de cepas para la prueba de degradación de endosulfán

Para realizar las primeras pruebas de degradación, en este paso se seleccionaron las dos cepas que mayor crecimiento mostraron en placa y que pasaron la prueba de inhibición. Las otras cepas se analizarán posteriormente en futuros estudios. La metodología de esta sección y del ensayo de degradación fue según Jimenez-Torres et al. (2016) con modificaciones.

Para obtener los inóculos bacterianos puros aclimatados al endosulfán, se tomó con el asa estéril una colonia de la cepa de interés y se la diluyó en 100 mL de caldo nutritivo LB

con 0,25 ppm de endosulfán. Se incubó a una temperatura de 30 °C a 150 rpm, durante 72 h. Se centrifugó el cultivo a 10000 rpm durante 10 minutos y el pellet se resuspendió en 25 mL de medio mineral, posteriormente se realizaron tres lavados bajo las mismas condiciones. Finalmente, se resuspendieron cada una de las cepas bacterianas en 25 mL de agua destilada estéril y se homogenizaron en el vórtex. Este inóculo bacteriano fue utilizado para los experimentos de degradación de endosulfán según el diseño descrito a continuación y las cepas aclimatadas se llamaron C1 y C2. Además, se tomó una alícuota de cada suspensión para su conservación en glicerol 20 % (0,8 mL inóculo + 0,2 mL glicerol) en tubos eppendorf y congelados a -23 °C.

3.5.5 Ensayo de degradación

Con las cepas C1 y C2 se realizó el ensayo de degradación en frascos Erlenmeyer (125 mL) con válvulas mininert, en condiciones herméticas. Además de los 3 mL de inóculo de la cepa aislada, se agregó MM estéril y como única fuente de carbono se adicionaron 120 µL de una solución 5000 ppm de endosulfán p.a. en acetona, permitiendo evaporar completamente el solvente antes de cerrar herméticamente. La concentración alcanzada en cada frasco fue de 20 ppm de endosulfán. Los frascos se incubaron a una temperatura de 27 °C a 150 rpm, y fueron protegidos con papel aluminio con el fin de evitar la posible fotodegradación del endosulfán. La duración del ensayo fue de 54 días para C1 y 40 días para C2.

El diseño fue el siguiente:

MM (27 mL) + Endosulfán (20 ppm) + inóculo Cepa 1 (3 mL) (x triplicado)

MM (27 mL) + Endosulfán (20 ppm) + inóculo Cepa 2 (3 mL) (x triplicado)

MM (27 mL) + Inóculo Cepa 1 (3 mL) (x duplicado): Control endógeno C1

MM (27 mL) + Inóculo Cepa 2 (3 mL) (x duplicado): Control endógeno C2

MM (30 mL) + Endosulfán (20 ppm) (x duplicado): Control abiótico

3.5.6 Actividad metabólica

La actividad metabólica se estimó mediante la producción de CO_2 y fue medido cada 48 hs durante todo el ensayo. La muestra gaseosa de 500 μL se tomó del headspace del frasco por duplicado. La cuantificación se realizó en cromatógrafo de gases Fisher Gas Partitioner Modelo 1200, con detector de conductividad térmica (TCD), una columna de carboxsphere® 80/100, con helio como gas portador y operando a las siguientes temperaturas: columna 50 °C, detector 150 °C, inyector 50 °C (Imagen 3.6). El software utilizado fue Clarity™ (DataApex Software).



Imagen 3.6: Equipo de cromatografía gaseosa empleado en la detección de CO_2

3.5.7 Análisis de plaguicidas

3.5.7.1 Extracción líquido-líquido

Se filtró el contenido de cada microcosmos usando un matraz kitasato conectado a una bomba de vacío y se emplearon membranas de poliamida con poro de $0,45\ \mu\text{m}$ de diámetro. La extracción del endosulfán se realizó adicionando 33 mL de diclorometano a las muestras filtradas, las cuales fueron sometidas a agitación magnética durante 10 minutos para promover la interacción entre las fases orgánica y acuosa. Luego se pasaron a embudos de decantación y se mantuvieron en reposo por al menos 5 minutos (imagen 3.7). Una vez recuperada la fase acuosa, se repitió el procedimiento dos veces más, adicionando la misma cantidad de diclorometano. A la fase orgánica se la filtró a través de un embudo con sulfato de sodio anhidro para eliminar cualquier resto de humedad. Luego se concentró por rotaevaporación a 50°C para eliminar el solvente de extracción. Por último se agregó n-hexano para recuperar y se aforó hasta un volumen final de 10 mL.



Imagen 3.7: Extracción líquido-líquido en campana de extracción. A las izquierda embudos de decantación con la muestra y una cantidad equivalente de diclorometano. Debajo los embudos con sulfato de sodio. A la derecha el matraz kitasato empleado en la filtración.

3.5.7.2 Detección y cuantificación


La cuantificación del endosulfán residual se realizó por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas empleando la condiciones según el método US EPA 8270D (Agilent 6890N, MSD 5975B, USA con una columna 5 MS, Agilent, USA). La temperatura del detector y el inyector fue de 250°C y 200 °C respectivamente. La temperatura inicial y final del horno fue 90°C y 250°C con una rampa de 7°C min⁻¹. Se usó helio como gas portador. La determinación de la concentración de endosulfán se obtuvo mediante las curvas de calibración de sus isómeros (Material Suplementario F). Los porcentajes de degradación de endosulfán se calcularon con base en la recuperación del mismo en los controles abióticos y en los sistemas de degradación, es decir aquellos con inóculo de C1, C1 y endosulfán. El límite de detección para esta técnica fue de 0,21 µg/L.




3.6 Resultados




3.6.1 Aislamiento y purificación

Se aislaron siete cepas bacterianas con capacidad de crecer en presencia de endosulfán en ambas concentraciones. Al aplicar las tinciones correspondientes, se obtuvo una sola cepa Gram positiva y las otras seis Gram negativas. En el medio PDA no se consiguió aislar ningún hongo. Los resultados se sintetizan en el cuadro 3.6 y en el cuadro 3.7 se muestran las mismas cepas en detalle al microscopio (aumento 100X). Se le asignaron códigos para identificar a las cepas purificadas.

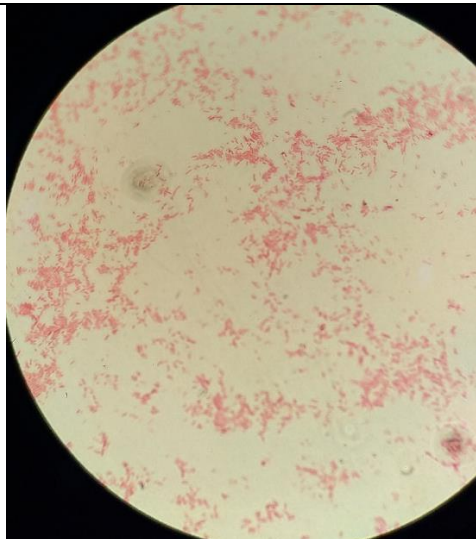
Cuadro 3.6: Resultados de la purificación, identificación morfológica y tinción Gram.

| Código identificador de cepa | Característica microscópica | Medio | Dosis inicial (ppm) | Morfología de colonias |
|------------------------------------|--------------------------------|-------|---------------------------|---|
| A1 R2 | Bacilo GRAM (-) | PDA | 22 |  |

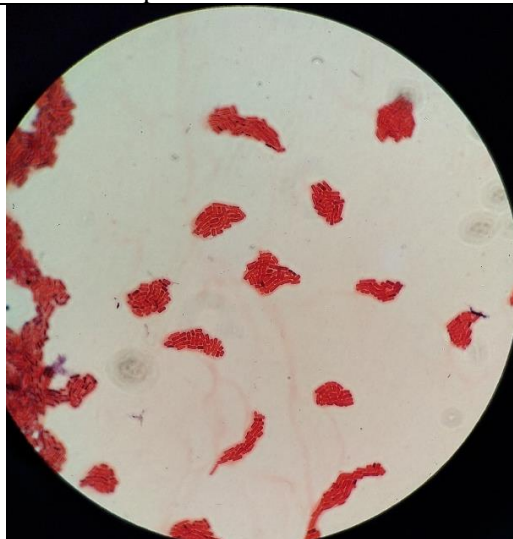
| | | | | |
|----------|--------------------|----|------|---|
| A2 C4 R2 | Bacilo GRAM (-) | LB | 22 |  |
| A1 C1 R2 | Bacilo GRAM (-) | LB | 22 |  |
| B1 C1 R2 | Bacilo GRAM (+) | LB | 2000 |  |

| | | | | |
|----------|-----------------------|-----|------|---|
| B2 R2 | Coco GRAM (-) | PDA | 2000 |  |
| B1 R2 | Coco GRAM (-) | PDA | 2000 |  |
| B2 C1 R2 | Diplococo GRAM (-) | LB | 2000 |  |

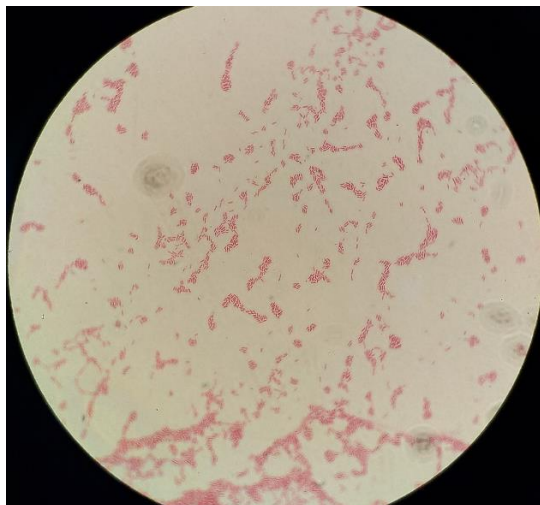
Cuadro 3.7: Colonias en tinción Gram observadas al microscopio en aumento de 100X



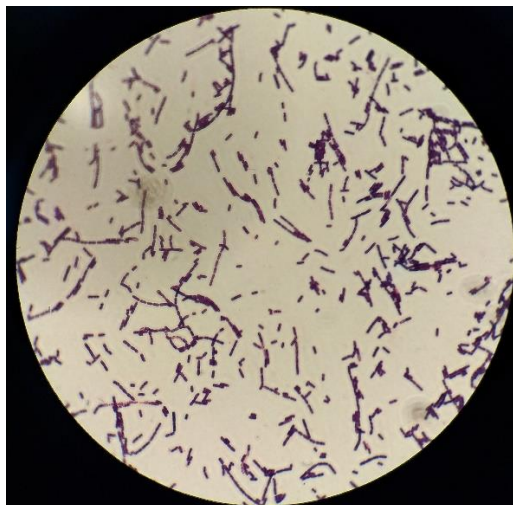
A1 R2



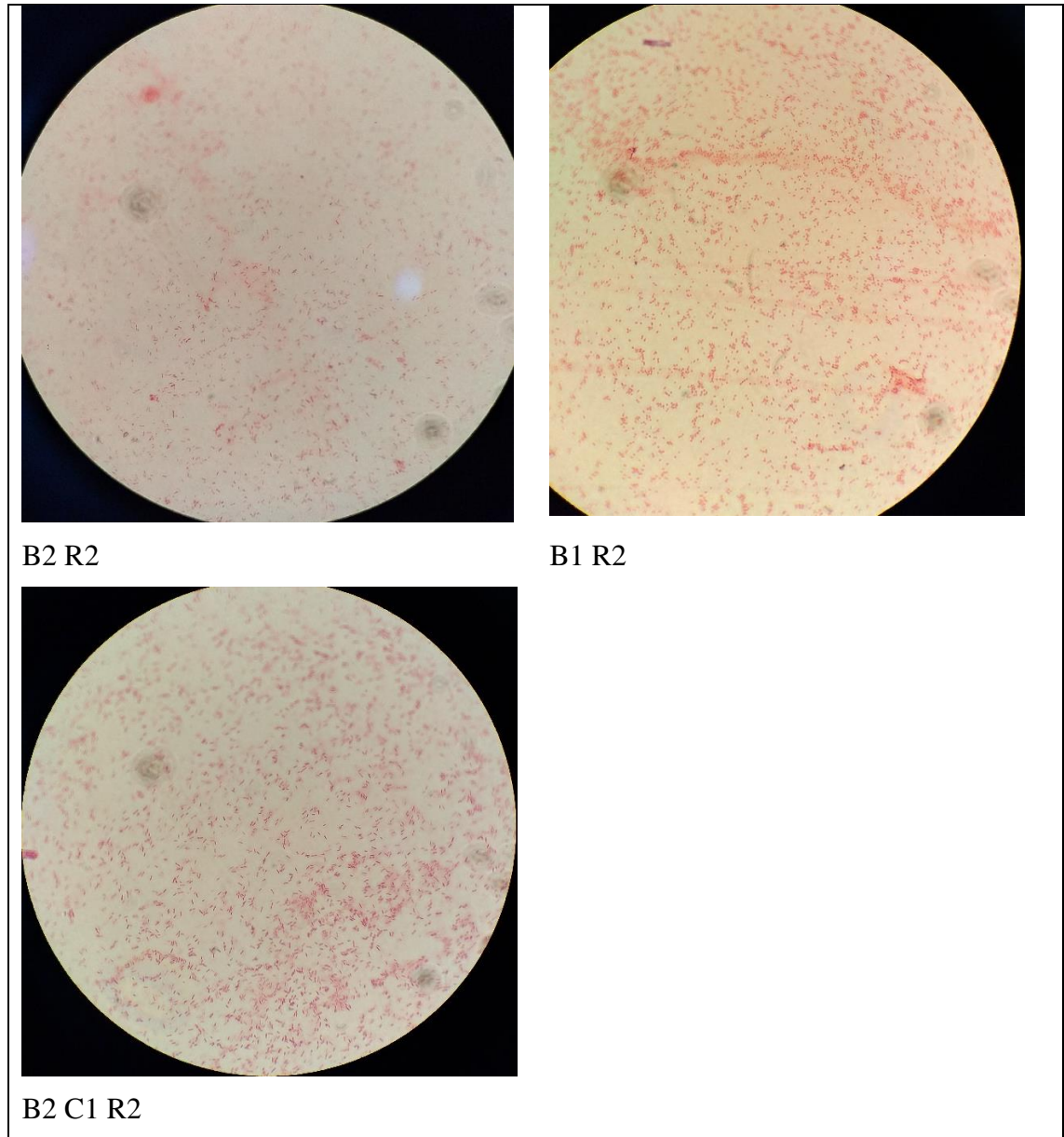
A2 C4 R2



A1 C1 R2



B1 C1 R2



3.6.2 Prueba de Inhibición

En las pruebas de inhibición en placa, se observó crecimiento sobre los discos impregnados con endosulfán en seis de las siete cepas. La única que mostró leve inhibición alrededor del disco fue B1 R2 (imagen 3.8).

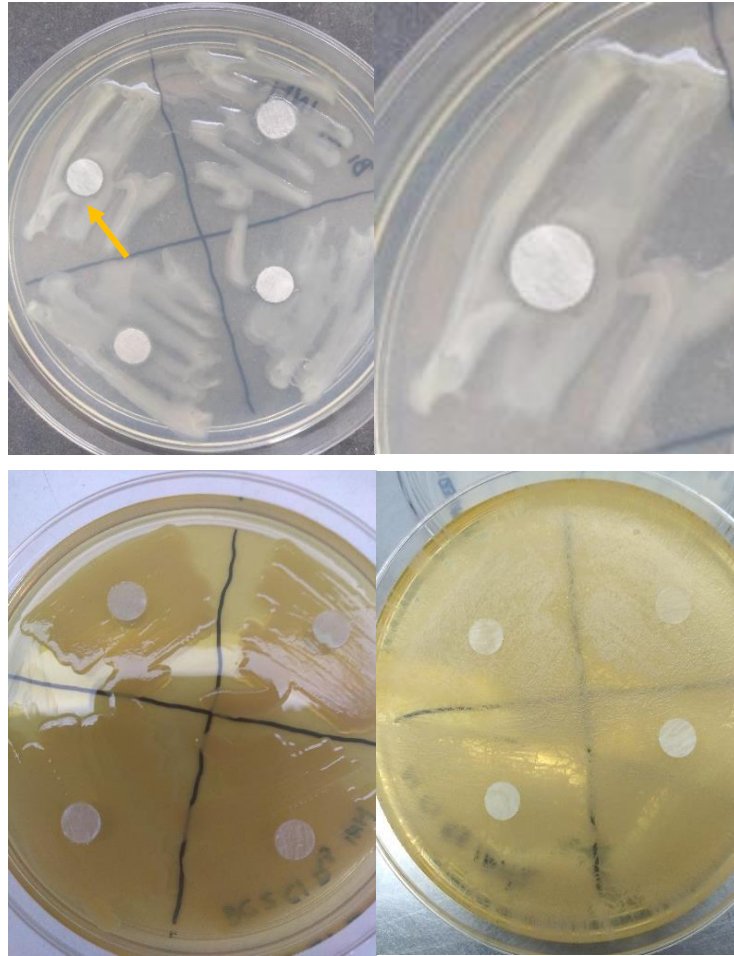


Imagen 3.8: Resultado de la prueba de inhibición. Arriba a la izquierda (B1 R2) sufrió una leve inhibición que se identifica como un anillo traslucido alrededor del disco de papel (señalado por la flecha), arriba a la derecha es la imagen ampliada del anillo de inhibición. Abajo se muestran otras cepas con crecimiento normal alrededor del disco.

3.6.3 Ensayo de Degradación

Se evaluaron dos de las seis cepas que presentaron rápido crecimiento en placa: la A2 C4 R2 a la que se llamó C1 y la B1 C1 R2, a la que se llamó C2. El control abiótico tuvo un porcentaje de recuperación de endosulfán total del 77% respecto al valor teórico aplicado de 20 mg/L. En 54 días, la cepa C1 degradó el $38,38\% \pm 3,53$ del isómero α respecto al control abiótico y un 53% del isómero β . En 40 días, la cepa C2 degradó el $13,07\% \pm 1,36$ del α -endosulfán y 59% del isómero β . No se identificaron productos de degradación.

3.6.4 Actividad metabólica

El ensayo de degradación se acompaña con los datos de CO_2 como indicador de la actividad metabólica. En el control abiótico los valores de CO_2 fueron cero en todos los casos. A continuación, se presentan gráficamente los resultados de C1 y C2 y los controles endógenos, es decir con inóculo y sin endosulfán. Se observa en la figura 3.11 que la actividad asociada a la metabolización del endosulfán comienza a las 384 horas, aumenta y luego se mantiene por sobre los niveles del control. En cambio, en la figura 3.12 se puede observar que los valores del tratamiento con endosulfán son similares a los del control endógeno, si bien en algunas fechas es significativamente mayor, luego descende. El valor alrededor del cual oscilan ambos tratamientos es 0,01 mg CO_2 , similar al del control endógeno de la cepa C1.

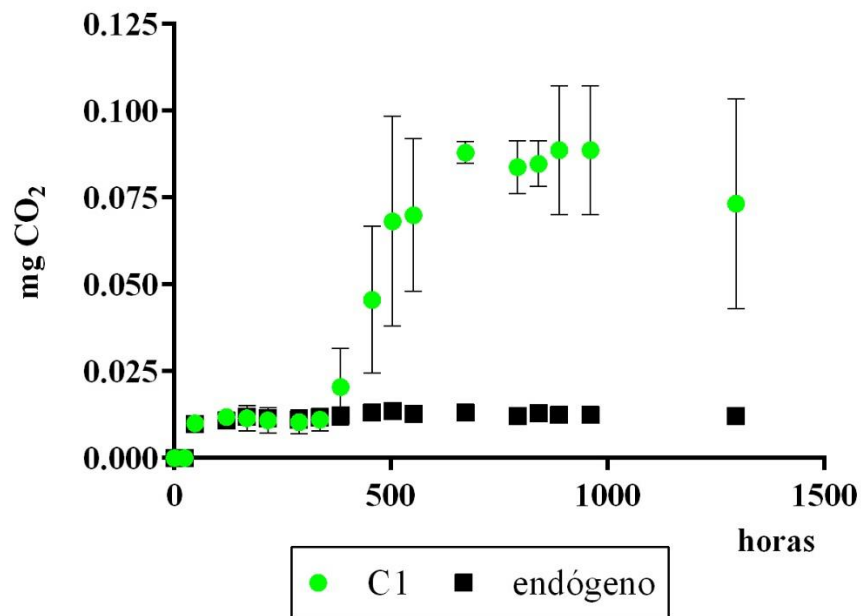


Fig. 3.11: Evolución del CO_2 emitido por la cepa 1 en presencia (C1) y en ausencia (endógeno) de endosulfán. Las barras representan el desvío estándar. Para C1 ($n=3$) y para el endógeno ($n=2$)

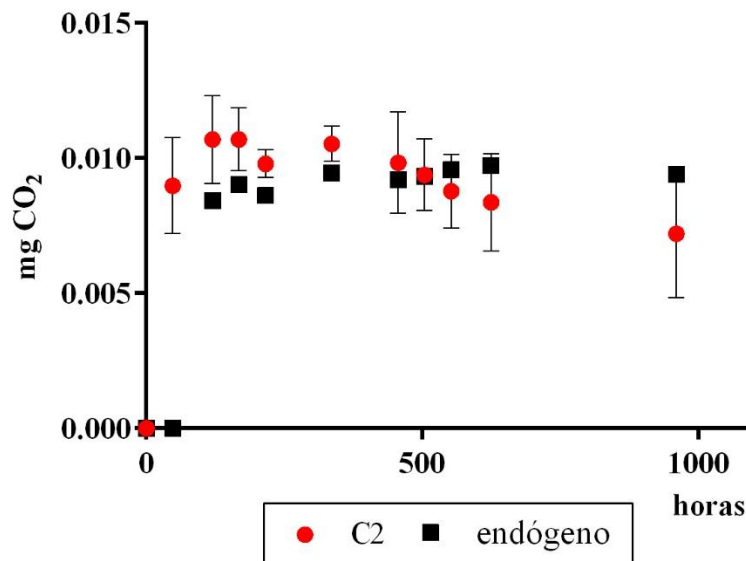


Fig. 3.12: Evolución del CO₂ emitido por la cepa 2 en presencia (C2) y en ausencia (endógeno) de endosulfán. las barras representan el desvío estándar. Para C2 (n=3) y para el endógeno (n=2)

3.7 Discusión y conclusiones

En esta parte B del capítulo se apuntó a responder *quiénes* son los microorganismos provenientes de un suelo hortícola convencional capaces de degradar endosulfán. Se sabe que esta respuesta está limitada por la técnica, puesto que deben ser cultivables pero al mismo tiempo esta característica es la que hace posible pensar en posteriores técnicas de bioaumentación. En este ensayo se obtuvieron en una primera etapa seis cepas bacterianas con capacidad de sobrevivir en presencia de endosulfán y ninguna cepa fúngica creció en las placas de PDA. Al respecto, se halló que el endosulfán tiene efectos inhibitorios de corta vida en hongos, aumentando así la población de bacterias (Xie y Wang 2011). Al comparar los resultados de las dos cepas evaluadas para la degradación, se halló que C1 creció utilizando endosulfán únicamente como fuente de carbono el cual mineralizó y la cepa C2, la producción de CO₂ no se distinguió significativamente del control endógeno por lo que no es concluyente la prueba. Dado que su crecimiento en placa de agar fue de los más veloces, cubriendo toda la placa en 24 h (cuadro 3.6 cepa B1 C1 R2), una posible explicación para la

baja actividad de C2 es que el inóculo no fue lo suficientemente concentrado desde el inicio, muy posiblemente por un error experimental al momento de conservar la cepa pura en glicerol.

Entre C1 y C2, la primera tuvo mayor capacidad de degradar el isómero α (38,4% contra 13%). En cuanto al isómero β , la capacidad fue similar (53 y 59% respectivamente), y a la vez este isómero fue más lábil que el α , lo cual coincide con lo reportado por Jiménez-Torres et al. (2016) en condiciones similares, pero que discrepa con lo hallado en la parte A de este capítulo (β -endosulfán más persistente que el α - en suelos), la explicación para esta diferencia es su mayor coeficiente de partición en suelo (Tiwari y Guha 2012) y su mayor susceptibilidad a la hidrólisis (Goebel et al. 1982), factores que podrían explicar una mayor disponibilidad y una mayor eficacia de la maquinaria enzimática en el proceso de degradación biótico.

En relación a otros trabajos, los valores de degradación son bajos (ver la revisión de Kataoka y Takagi 2013) y poco atractivos para diseñar técnicas de bioaumentación. Para dar una referencia, los autores que aislaron cepas degradadoras de endosulfán mencionados en la introducción de este capítulo, obtuvieron porcentajes entre 76-86% de degradación en condiciones similares.

Las evaluaciones de las otras cuatro cepas quedaron a cargo de la Dra. Ortiz-López y equipo. Con las cepas obtenidas, se contempla la posibilidad de combinar inóculos, diseñar consorcios y ensayarlos en medio líquido, en microcosmos de suelo e incluso combinarlos con la adición de materia orgánica como lo han hecho exitosamente Pimmata et al. (2013).

La importancia de la parte B de este capítulo es que es un paso imprescindible dentro un objetivo mayor que es evaluar la bioaumentación como estrategia de biorremediación (objetivo que no fue parte tesis).

Capítulo 4. Evaluación de enmiendas orgánicas para la biorremediación de suelo impactado con clorpirifos y endosulfán

Publicacion derivada de este capítulo:

Use of okara in the bioremediation of chlorpyrifos in soil. Effects on soil biochemical properties. Tejada M., Parrado J., Gomez I., Franco-Andreu L., Orts A., Cabrera S. Applied Soil Ecology 121 (2017): 172-176

4.1 Introducción

Aplicar diferentes fuentes de materia orgánica a los suelos contaminados por plaguicidas persistentes es una técnica ambiental ampliamente utilizada entre científicos e ingenieros ambientales (Tejada et al. 2011a, 2011b, 2014; Gómez et al. 2014). Por un lado, la mineralización de esta materia orgánica libera nutrientes que estimulan el crecimiento de microorganismos tolerantes a xenobióticos, provocando una aceleración en la biodegradación de dichos compuestos químicos. En el caso del compost, éste actúa como inóculo de poblaciones bacterianas o fúngicas ausentes o en baja proporción en el suelo a remediar (Adam et al. 2015), o puede tener un efecto matriz acelerador de la degradación, como probaron Kästner y Mahro (1996) para el caso de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Por otra parte, se encontró que el material aplicado también es capaz de adsorber plaguicidas, reduciendo su concentración en la solución del suelo y limitando su biodegradación (Delgado-Moreno y Peña 2009; Gómez et al. 2014).

En los últimos años se han obtenido varios bioestimulantes (BS) a partir de diversos desechos orgánicos tales como barros cloacales, plumas de pollo, granos húmedos de destilería, extracto de salvado de arroz, extracto enzimático de germen de algarrobo, todos con el fin de ser utilizados en la biorremediación de suelos contaminados con diversos xenobióticos orgánicos (plaguicidas e hidrocarburos) (Tejada et al. 2010, 2011a, 2011b, 2014, Gómez et al. 2014; Rodríguez-Morgado et al. 2015).

El okara es un subproducto obtenido de la fabricación de leche de soja, tofu y sus derivados. En la actualidad, y según Choi et al. (2015), en todo el mundo se estima que se generan anualmente 14 millones de toneladas de okara. Su alto contenido de fibra (56%) y proteínas (29%) hace de este subproducto una fuente excepcional para la industria

alimentaria (Redondo-Cuenca et al. 2008; Villanueva-Suárez et al. 2013; Park et al., 2015). La producción de un nuevo BS basado en okara podría ser una nueva alternativa para la recuperación de suelos contaminados.

Por otro lado, el bokashi (BKS), palabra japonesa referida para el abono orgánico fermentado es una mezcla empleada por la agricultura orgánica como mejorador del suelo. Es una fermentación de materiales de origen animal y vegetal en un proceso aeróbico. No existe una fórmula única para la elaboración del bokashi. La composición de este abono se ajusta a las condiciones y materiales existentes en las comunidades, pero fundamentalmente los ingredientes son: estiércol, carbón, salvado de trigo, o arroz, rastrojo o aserrín, melaza, lavaduras, carbonato de calcio y agua (Restrepo 2010). Se han registrado experiencias exitosas con BKS de Centroamérica y Brasil impulsadas por la FAO y por los departamentos de agricultura nacionales (FAO 2011; Ramos Agüero et al. 2016). Entre las ventajas que presenta el bokashi se pueden mencionar: el aumento de microorganismos benéficos en el suelo, incremento de la biodiversidad, producción de abono en un tiempo corto, no produce malos olores y proporciona al suelo sustancias orgánicas como aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos, enzimas y sustancias antioxidantes (Bertolí Herrera et al. 2015).

La madera rameal fragmentada o BRF (del francés *bois raméaux fragmentés*) ha sido utilizada como estrategia para aumentar la productividad en cultivos orgánicos en Canadá y consiste en fragmentar ramas jóvenes frescas de árboles y arbustos para utilizarlas como cubierta del suelo (mulching) y favorecer la pedogénesis (Caron 1994). La característica deseable de éstas es el bajo contenido de lignina polimerizada y el alto contenido de hormonas, enzimas, aminoácidos, celulosa, hemicelulosa, almidón y proteínas junto con una relación C/N de entre 30/1 a 150/1 (Lemieux 1996), indicando que podría ser una fuente de

energía y nutrientes para la microbiota del suelo, actuando como bioestimulante. Se ha encontrado un solo trabajo que la propone como estrategia para la estabilización de elementos traza en suelos (Hattab et al. 2015) pero ninguno sobre su interacción con plaguicidas.

Por último, la cama de pollo es un residuo sólido de la producción avícola compuesto por el material de la cama, las excretas, alimento no utilizado, agua y plumas. Su calidad y composición varía rápidamente con el tiempo según lo describió Riera et al. (2014). Los productores del cinturón hortícola platense lo emplean frecuentemente como fertilizante junto con otros de origen químico. Este material se encuentra disponible en la provincia de Buenos Aires, junto con la de Entre Ríos, donde se concentra gran parte de la producción avícola del país. La cama de pollo se distribuye en las quintas hortícolas donde es estacionada y en ocasiones es mezclada con restos vegetales, hasta su incorporación al suelo (comunicación personal con productores; McCormick et al. 2019). Dentro de las potencialidades de la cama de pollo se destaca su aporte de materia orgánica, nitrógeno y fósforo (Gange 2014).

La utilización de estos materiales orgánicos como BS sería una alternativa con un enfoque novedoso, dado que no se han registrado a la fecha trabajos que describan el uso de okara como subproducto inalterado o como BS, de bokashi, BRF o de cama de pollo en la biorremediación de suelos contaminados por xenobióticos orgánicos.

En relación con la utilización de metodologías sencillas que permitan realizar evaluaciones ecotoxicológicas, el bioensayo de germinación con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*) es una prueba estática de toxicidad aguda, y fue desarrollada para residuos orgánicos o compost. Este ensayo se basa en el hecho de que durante la germinación la plántula es muy sensible a sustancias tóxicas disueltas en bajas concentraciones, las cuales

alteran su supervivencia y desarrollo. La evaluación del efecto tóxico de estos compuestos solubles en la elongación de la radícula de las plántulas, es un indicador para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta adulta. El bioensayo permite ponderar este efecto en niveles tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación pero, sin embargo, pueden retardar o inhibir el desarrollo de la radícula.

Con el objetivo de monitorear cambios en calidad del suelo, está aceptado entre quienes se dedican a la ciencia del suelo que las propiedades bioquímicas (especialmente el estudio de las actividades enzimáticas) son excelentes indicadoras de la calidad del suelo porque son más sensibles que las propiedades físico-químicas (Paz-Ferreiro et al., 2010, Bera et al., 2016). Por lo tanto, la medición de las actividades enzimáticas puede proporcionar información sobre el comportamiento del clorpirifos en el suelo, así como los efectos que este insecticida puede causar sobre la actividad metabólica del suelo (Tejada et al. 2011b, 2014, Franco-Andreu et al., 2016).

4.1.1 Objetivo general

- Evaluar distintas fuentes de materia orgánica como potenciales bioestimulantes de la degradación de endosulfán y/o clorpirifos en suelo.

4.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar químicamente a los potenciales bioestimulantes.
- Evaluar su impacto sobre la actividad microbiológica.

Para esto se realizaron dos experimentos que serán detallados por separado en la Parte A y Parte B.

4.1.3 Hipótesis

La adición de enmiendas orgánicas actúa como bioestimulante sobre la

microbiota con capacidad degradadora de estos plaguicidas y como consecuencia disminuye significativamente su tiempo de persistencia.

Parte A:

- Evaluar enmiendas orgánicas utilizadas en horticultura (cama de pollo, bokashi y madera rameal fragmentada) como bioestimulantes en la degradación de clorpirifos y endosulfán.

- Evaluar la fitotoxicidad de dichas enmiendas.

Parte B:

- Evaluar un residuo de la industria alimenticia (okara) en dos estados: puro e hidrolizado como bioestimulante en la degradación de clorpirifos.

- Evaluar el impacto sobre la actividad microbiológica a través de la actividad enzimática.

PARTE A

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Suelo

El suelo utilizado como control y usado para ser mezclado con los BS provino de la Reserva Natural Parque Pereyra Iraola ubicada a 20 km de la ciudad de La Plata, el sitio no tiene historia de aplicación de plaguicidas y su uso actual es recreativo. El suelo de la región está clasificado como un Argiudol vértico, la muestra se tomó en un claro cuya cobertura era del 100% dominado por gramíneas (imagen 3.1 c en capítulo 3). Se lo tomó con pala de los primeros 20 cm, se lo secó al aire y se lo tamizó con una malla de 2mm. Sus características físico-químicas se detallan en el cuadro 3.2 del inciso 3.3 como SR. El suelo se conservó a 5 °C hasta el momento de su utilización.

4.2.2 Plaguicidas

Ambos insecticidas se aplicaron en una única solución acuosa, utilizando sus formulados comerciales clorpirifos, Lorsban® (Dow AgroSciences, 48%p/v) y endosulfán, Thionex® (EC, 35%p/v, Makhteshim) aplicados según las dosis máximas recomendadas (5 y 3 L ha⁻¹ respectivamente). Los cálculos se hicieron en base a la superficie del recipiente empleado (192cm²), lo cual resultó en un volumen de 6 µL de Thionex y 10 µL de Lorsban por recipiente.

4.2.3 Bioestimulantes

El BRF se obtuvo del campus de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires en la primavera del 2017. Se podaron las ramas jóvenes de tres especies de árboles abundantes en Buenos Aires y de fácil acceso: sauce criollo (*Salix humboldtiana*), álamo (*Populus nigra*) y paraíso (*Melia azedarach*). El criterio de selección de ramas no lignificadas era su flexibilidad, no debían partirse al doblarlas (imagen 4.1). Se eliminaron las hojas y se cortaron en trozos de 2-3cm empleando tijeras de jardinería. El diámetro de los fragmentos se encontraba entre 0,1-0,7 cm (imagen 4.2). Se pesaron cantidades iguales de fragmentos de cada especie para luego triturarlas en una multiprocesadora doméstica hasta obtener el material homogéneo y triturado que llamamos BRF (imagen 4.3). Hasta el momento de ser utilizado el material se conservó en bolsas plásticas a 5 °C.



Imagen 21: Ramas jóvenes de álamo recién podadas



Imagen 4.2: Fragmentos de ramas jóvenes



Imagen 4.33: Producto final (BRF) recién triturado y listo para usar.

El bokashi se elaboró en el Centro de Información y Formación Ambiental (CIFA) perteneciente al Gob. de la Ciudad de Buenos Aires en julio del 2017. La materia prima para este abono y las proporciones fueron: cuatro partes de cómpost de estiércol de vaca y caballo proveniente del Mercado de Liniers (cada parte es una carretilla de 0,08 m³ de capacidad); 4 partes de rastrojo; 4 partes de estiércol de vaca y caballo + cama (aserrín); 1 parte de salvado de trigo; 1 parte de carbón vegetal; 2 L de melaza; 1/2 kg de levadura, 1/2 kg de harina de roca; agua.

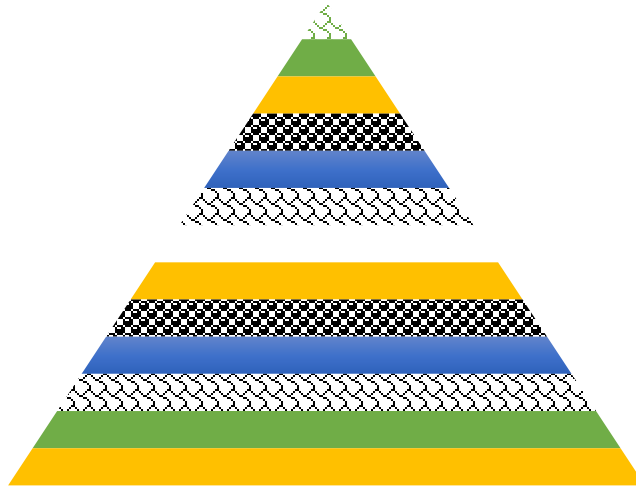


Fig. 4.1: Esquema de pila de Bokashi. Los materiales se agregan en capas sucesivas y se repite el orden hasta agotarse. El orden es indistinto.

Los materiales se agregaron en capas, repitiendo el orden como muestra la figura 4.1, hasta obtener una pila que luego se volteó formando una mezcla homogénea. Se dejó estacionar durante 15 días, con volteos intermedios cada 3 días en un proceso totalmente aeróbico. Posteriormente, se conservó en pilas cubiertas con polietileno negro a la sombra. Al momento del experimento se lo trituyó en un molinillo eléctrico para homogenizarlo y reducir en tamaño los fragmentos de carbón y agregados de materia orgánica.

La cama de pollo provino de un establecimiento avícola de la provincia de Entre Ríos y se dejó estacionado bajo un cobertor de polietileno oscuro y a la sombra por 60 días antes de su uso, a una temperatura ambiente (media de 15,1 °C, según el Servicio Meteorológico Nacional). Los análisis fisicoquímicos corresponden al momento previo a su uso (imagen 4.4).



Imagen 4.44: Cama de pollo empleada en el ensayo.

4.2.4 Diseño del experimento

Se colocaron 200 g de suelo seco en bandejas de aluminio (8 x 24 cm) a los que se les aplicó la emulsión de plaguicidas, llevando la humedad final del suelo al 30% de la capacidad de campo. Luego de homogenizar se agregó a cada bandeja los diferentes BS, partiendo de una cantidad de compost de cama de pollo de 35 t/ha (entre 20-30 t/ha aplican los productores hortícolas según Baccaro et al. 2006; 20-50 t/ha es lo recomendado según Zubillaga y Branzini en Álvarez 2012) y de modo de adicionar cantidades equivalentes de materia orgánica con cada BS, siendo el resultado final : 200 g de suelo con 82 g de CP, 91 g de BRF, 233 g de BKS. Se compensó la diferencia de humedad agregando agua destilada. Luego de homogenizar, cada bandeja se cubrió con film para disminuir la evaporación y se dejó incubando en oscuridad a 25 °C. Los muestreos se realizaron a los 0,5, 7, 20, 30, 60, y 120 días de iniciado el ensayo.

Los tratamientos tuvieron cuatro réplicas cada uno y fueron los siguientes:

C: Suelo Control + Plaguicidas

BRF: Suelo + BRF + Plaguicidas

BKS: Suelo + BKS + Plaguicidas

CP: Suelo + BCSH + Plaguicidas

4.2.5 Análisis de los bioestimulantes (BS)

Para conocer el porcentaje de Materia Orgánica (MO%) se empleó el método de pérdida por ignición (Margasin y Schinner 2005), empleando una mufla y llevando a 550 °C un crisol de porcelana con un peso conocido del material previamente secado a 105 °C en estufa por 24 horas (imagen 4.5). La diferencia de pesos indica la cantidad de materia orgánica que se calcinó.



Imagen 4.5: BRF luego de la incineración a 550°C. Cuando el material es rico en MO se usa una tapa de aluminio en todo momento para evitar la pérdida de cenizas durante la manipulación.

El pH se midió en solución 1:5 p/p en agua destilada debido a la elevada capacidad de absorción de estos materiales. Al no hallar bibliografía, la medición de pH del BRF se realizó bajo distintas condiciones tomando alguna de las ideas de Sitholé (2005) que trabajó con viruta y madera. En primer lugar, se modificó el tiempo de contacto entre el material (recién

molido y listo para su uso) y el agua. Se pesaron 10 g de BRF fresco con 50 mL de agua y se prepararon 9 vasos de precipitados para poder medir a las 2, 24 y 48 horas (cada una por triplicado). Además, se comparó la influencia del contenido de humedad en la muestra, midiendo el pH del BRF secado en estufa a 105 °C durante 24 h, y en BRF fresco, ambos con dos horas de contacto en solución.

Otros parámetros químicos como el Nitrógeno total Kjeldahl, P, K, Ca y Mg se analizaron en un laboratorio comercial. En el caso de P, K, Ca, Mg, K y Na se realizaron extracciones del suelo con una solución NH_4Ac 1 M a pH 7. El P, K, Ca y Mg se determinó por absorción atómica y el K y Na por fotometría de llama. Los micronutrientes se extrajeron con digestión húmeda nítrico-perclórica y la determinación fue por absorción atómica

4.2.6 Análisis de los plaguicidas

En cada tiempo de observación se homogenizó el total de la bandeja, y se submuestreó siempre la misma cantidad de suelo+BS: 17 g para BKS, 11 g para CP y BRF, 8 g suelo control, cantidades que representan el 4% de la masa total inicial de cada una.

Las muestras de suelo, suelo+BS y sus respectivas curvas de calibrado se extrajeron según lo descrito en el inciso 2.2.3.1 y se analizaron en un cromatógrafo de gases AutoSystem XL Perkin-Elmer (Norwalk CT, USA) con inyector automático y acoplado a un detector tipo ECD, con una columna capilar de PE-5, (5% difenilpolisiloxano - 95% dimetilpolisiloxano fase estacionaria) de 30 m de longitud, 0,25 mm diámetro interno y 0,25 μm de espesor de película. Las condiciones de corrida fueron: temperatura del inyector: 280 °C; temperatura del ECD: 375 °C; temperatura del horno: 190 °C por 1,5 min, 45 °C·min⁻¹ hasta 300 °C luego 10 °C·min⁻¹ hasta 320 °C y constante 2 min; volumen de inyección 1 μL , en modo Split (10:1); gas fase móvil: N_2 , 30 psi; flujo auxiliar de ECD de 30 mL·min⁻¹. El

software utilizado fue TotalChrom Navigator versión 6.3.2 © PerkinElmer, Inc. Previamente se prepararon curvas de calibrado suelo+BS (en proporción 1:1) para conocer el porcentaje de recuperación del plaguicida en presencia de BS. Dichas curvas de calibrado se reportan en el Material Suplementario G. Las muestras del experimento con BS se cuantificaron empleando esta curva y las muestras del control (suelo) se cuantificaron con la curva de calibrado de suelo.

4.2.7 Actividad enzimática deshidrogenasa

La actividad se midió según lo descrito en el capítulo 3 inciso 3.2.5.3 en el tiempo 0 y a los 30 días de comenzado el experimento.

4.2.8 Ensayo de fitotoxicidad

El método consiste en exponer semillas de especies sensibles, como la lechuga, a un extracto de compost y comparar su tasa de germinación y de elongación de las radículas con las de las mismas semillas expuestas a agua destilada.

Previo a la implementación de la prueba, se verificó que el lote de semillas tuviera un porcentaje de germinación superior al 90%, utilizando únicamente agua destilada. Para la prueba se evitó utilizar semillas que se alejaran de un tamaño medio, descartando aquellas o muy pequeñas o muy grandes.

Para el presente ensayo se evaluaron los bioestimulantes (CP, BKS, BRF) y el suelo (C). Cada tratamiento y el control (semillas expuestas solo a agua destilada) se realizaron por cuadruplicado. Las pruebas se realizaron en placas de Petri debidamente rotuladas donde se colocó un papel Whatman N°3.

Preparación del extracto: Se utilizó una relación 1:2,5 p/v según Warman. (1999). Se pesaron 20 g de enmienda o suelo, a los cuales se les adicionaron 50 mL de agua destilada. Para la cama de pollo, por su bajo contenido de humedad, fue necesario agregar 80 mL de agua para poder obtener un extracto. Se agitaron durante 20 h (agitador horizontal, 180 golpes/min). Luego el contenido se pasó a tubos Falcon de 50 mL y se centrifugó durante 15 minutos. El sobrenadante se filtró con el mismo papel del ensayo.

Sembrado de la placa: se dispensaron 5 mL del extracto obtenido, evitando la formación de burbujas entre la placa y el papel. A continuación, en cada placa se colocaron con pinza 20 semillas de lechuga variedad criolla *Lactuca sativa* (marca Ecoproductos) bien distribuidas (imagen 4.6). Las placas fueron tapadas y llevadas a incubadora en oscuridad a 22 °C durante 120 h.



Imagen 4.6:5 Preparación del bioensayo de toxicidad. Se colocan veinte semillas de lechuga en cada caja de Petri

Lectura: en cada placa se contó el número de semillas germinadas, considerándose como tales aquellas con una longitud radicular $>1\text{mm}$ (Ec. 4.1). También se contó el número de semillas que germinaron, pero de las que no emergió el hipocótilo (Ec. 4.2). Se midió la elongación de la radícula (Ec. 4.3) y el hipocótilo (Ec. 4.4) utilizando un calibre. Por último se calculó el Índice de Germinación (IG) (Ec. 4.5) en base a la cantidad de semillas germinadas y a la longitud de la radícula.

$$\text{Ecuación 4.1)} \quad \% \text{ Germinación} = \frac{\text{número semillas germinadas}}{\text{número de semillas germinadas en el control}} \times 100$$

$$\text{Ecuación 4.2)} \quad \% \text{ Elongación} = \frac{\text{número semillas con hipocotilo visible}}{\text{número de semillas con hipocotilo visible control}} \times 100$$

$$\text{Ecuación 4.3)} \quad \% LR = \frac{\text{longitud media radical tratamiento}}{\text{longitud media radical en el control}} \times 100$$

$$\text{Ecuación 4.4)} \quad \% LH = \frac{\text{longitud media hipocotilo tratamiento}}{\text{longitud media hipocotilo en el control}} \times 100$$

Ecuación 4.5) $IG = (\% G \times \% LR)/100$

Previo a retirar las plántulas de las cajas de Petri se realizó una observación detallada del estado general de las mismas para detectar cualquier indicador de fitotoxicidad o de crecimiento anormal (ápices radiculares con necrosis, pelos absorbentes poco desarrollados, necrosis en los cotiledones).

4.2.9 Análisis estadístico

Los datos de plaguicidas se analizaron según lo descrito en inciso 3.2.6. La actividad enzimática deshidrogenasa se analizó mediante ANOVA y el test de comparaciones múltiples LSD de Fisher, con el programa Infostat (Di Rienzo et al. 2014). Los resultados del test de fitotoxicidad se analizaron mediante un test no-paramétrico en el caso de %Germinación y %Elongación por no cumplir con el supuesto de normalidad. A los datos de %LH y %LR se les realizó un ANOVA.

4.3 Resultados

4.3.1. Características de los bioestimulantes

El análisis químico de los BS se muestra en el cuadro 4.1. El BKS es esperable que varíe dado que los materiales utilizados en su elaboración dependen de la disponibilidad en el lugar pero aun así sus características se asemejaron a las de Bertolí et al. 2015. Los valores de cama de pollo en estos resultados se asemejan a otros descriptos en la bibliografía (Tiquia y Tam 2002; Calandrelli y Falcón 2018).

Cuadro 4.1: Composición química (media \pm desv.est., n = 3) de los bioestimulantes. En donde no se presenta el desvío estándar es porque se trató de una muestra compuesta. BRF: madera rameal fragmentada, BKS: bokashi, CP: cama de pollo.

| | BRF | BKS | CP |
|----------------------|------------------|------------------|------------------|
| Materia orgánica (%) | 84,19 \pm 0,22 | 31,55 \pm 0,45 | 76,15 \pm 0,26 |
| Humedad (%) | 58,87 \pm 0,44 | 39,75 \pm 0,75 | 22,97 \pm 0,89 |
| pH (1:5) | 5,89 \pm 0,01 | 8,64 \pm 0,02* | 7,55 \pm 0,02 |
| CE (mS) | 3,7 \pm 0,00 | 12,8 \pm 0,06 | 14,1 \pm 0,04 |
| COT (%)** | 48,8 | 18,28 | 44,14 |
| N total Kjeldahl (%) | 1,16 | 1,28 | 1,8 |
| P (%) | 0,2 | 0,4 | 0,72 |
| K (%) | 1,64 | 1,3 | 1,75 |
| Ca (%) | 1,96 | 1,84 | 1,45 |
| Mg (%) | 0,16 | 0,42 | 0,34 |
| S (%) | 0,17 | 0,37 | 0,38 |
| Fe (ppm) | 665 | 11183 | 1763 |
| Mn (ppm) | 43 | 281 | 386 |
| Cu (ppm) | 33 | 57 | 68 |
| Zn (ppm) | 69 | 123 | 280 |

*pH (1:2,5); **calculado a partir de %MO usando el factor 1,725

4.3.2. Plaguicidas

4.3.2.1 Clorpirifos

Se obtuvieron las curvas de degradación (Fig. 4.2) y las vidas medias, luego del ajuste a ecuaciones cinéticas de primer orden, se muestran en el cuadro 4.2. En el caso del clorpirifos, la tasa de degradación fue significativamente mayor en suelo control (C) sin BS.

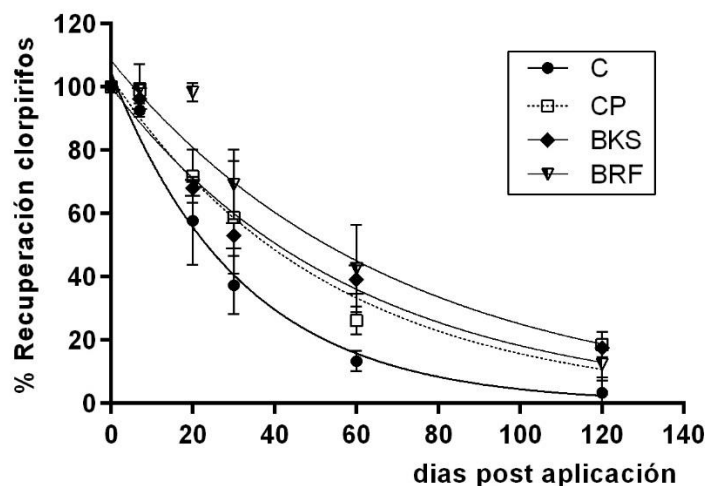


Fig. 4.2: Curvas de degradación de clorpirifos en suelo (C) y en suelo con los distintos bioestimulantes: cama de pollo (CP), bokashi (BKS), y madera rameal fragmentada (BRF). Se grafican las medias de 4 observaciones con su desvío estándar, y la función de ajuste exponencial decreciente para todos los tratamientos.

Comparando entre los BS no se distinguieron diferencias estadísticas y sus vidas medias -expresadas en días- quedaron ordenadas de la siguiente forma: C (22) < CP (37) < BKS (41) < BRF (48).

Cuadro 4.2: Datos cinéticos de las curvas de degradación de clorpirifos. Los valores representan medias (n=4). Dentro de cada fila, medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). C: control; CP: cama de pollo; BKS: bokashi; BRF: madera rameal fragmentada

| | C | CP | BKS | BRF |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Clorpirifos | | | | |
| R^2 | 0,96 | 0,91 | 0,96 | 0,9 |
| $t_{1/2}$ | 21,99a | 36,87b | 40,74b | 47,43b |
| IC 95% de $t_{1/2}$ | 18,94 - 26,22 | 30,58 - 46,43 | 36,27 - 46,46 | 38,45 - 61,89 |
| k | 0,03152 | 0,01880 | 0,01702 | 0,01461 |

4.3.2.2 Endosulfán

El endosulfán, tuvo una mayor tasa de degradación cuando se le agregó al suelo BKS y CP. Las curvas de degradación se muestran en la figura 4.3 y los datos cinéticos se detallan en el cuadro 4.3. Las vidas medias según los tratamientos quedaron ordenadas de la siguiente forma: BKS (21) < CP (29) < BRF (42) < C (62). La tasa de degradación en BRF

no se diferenci6 estadisticamente respecto del control. En todos los tratamientos se detect6 presencia y acumulaci6n del metabolito endosulf6n sulfato.

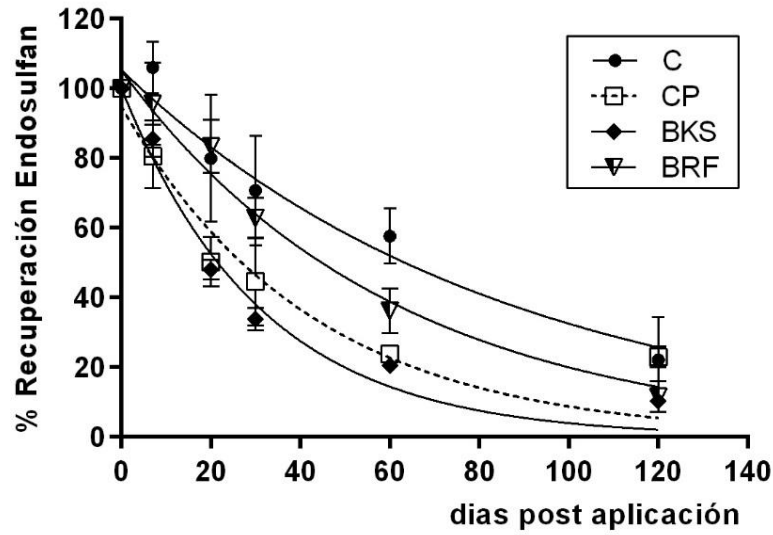


Fig. 4.3: Curvas de degradaci6n de endosulf6n en suelo (C) y en suelo con los distintos bioestimulantes: cama de pollo (CP), bokashi (BKS), y madera rameal fragmentada (BRF). Se grafican las medias de 4 observaciones con su desv1o est6ndar, y la funci6n de ajuste exponencial decreciente para todos los tratamientos.

Cuadro 4.3: Datos cinéticos de las curvas de degradación de endosulfán total (sumatoria de isómeros). Los valores representan medias (n=4). Dentro de cada fila, medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). C: control; CP: cama de pollo; BKS: bokashi; BRF: madera rameal fragmentada

| | C | CP | BKS | BRF |
|---------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| Endosulfán | | | | |
| R^2 | 0,8476 | 0,8700 | 0,9675 | 0,9490 |
| $t_{1/2}$ | 62,8c | 29,11ab | 21,47a | 41,73bc |
| IC 95% de $t_{1/2}$ | 49,31 to 86,42 | 23,37 - 38,59 | 19,01 - 24,66 | 36,05 - 49,52 |
| K | 0,01175 | 0,02381 | 0,03229 | 0,01661 |

Además, se analizó la cinética de los isómeros por separado (cuadro 4.4) y una vez más se observó que el isómero β es el más persistente, con una vida media estimada en 200 días en suelo sin enmienda. Como se muestra en la figura 4.4, el comportamiento en C y en CP se asemeja más a una función lineal que a una cinética de primer orden lo cual se ve reflejado en sus R^2 . A los 120 días, la mayor degradación de este isómero sucede en BRF, alcanzando una media de 24 % recuperación.

Cuadro 4.4: Datos cinéticos de las curvas de degradación de endosulfán discriminado por isómero. Los valores representan medias (n=4). Dentro de cada fila y para un mismo isómero, medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) C: control; CP: cama de pollo; BKS: bokashi; BRF: madera rameal fragmentada

| | C | | CP | | BKS | | BRF | |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
| Endosulfán | α - | β - | α - | β - | α - | β - | α - | β - |
| R^2 | 0,89 | 0,47 | 0,96 | 0,56 | 0,99 | 0,94 | 0,96 | 0,78 |
| $t_{1/2}$ | 39,13b | 199,5b | 15,24a | 128,4ab | 12,57a | 76,77a | 28,23b | 85,03a |
| IC 95% de $t_{1/2}$ | 31,60 - 51,36 | 130,5 - 427,7 | 13,34 - 17,77 | 88,82 - 231,5 | 11,65 - 13,64 | 66,89- 90,07 | 24,43 - 33,42 | 65,42 - 124,2 |
| k | 0,011 | 0,004 | 0,045 | 0,005 | 0,055 | 0,009 | 0,024 | 0,008 |

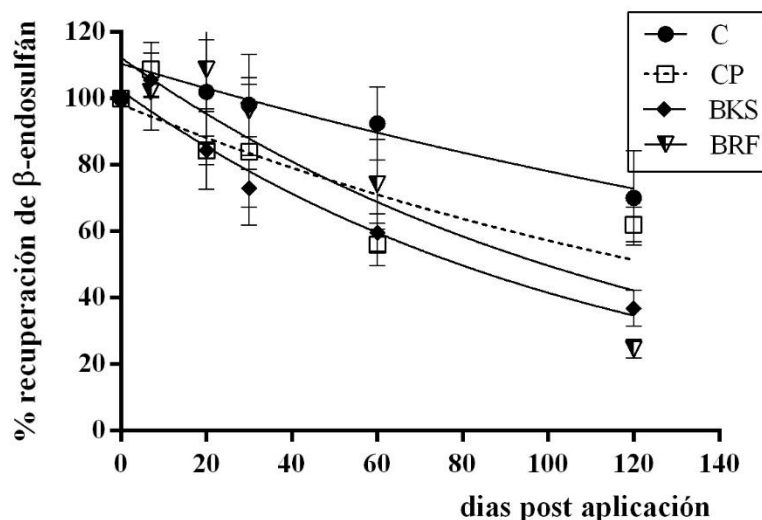


Fig. 4.4: Curvas de degradación de β -endosulfán en suelo (C) y en suelo con los distintos bioestimulantes: cama de pollo (CP), bokashi (BKS), y madera rameal fragmentada (BRF). Se grafican las medias de 4 observaciones con su desvío estándar, y la función de ajuste exponencial decreciente para todos los tratamientos.

4.3.3. Actividad enzimática deshidrogenasa (ADH)

La medición de la ADH en dos fechas del ensayo permitió distinguir entre tratamientos, los resultados se muestran en el cuadro 4.5.

Cuadro 4.5: Datos de actividad enzimática deshidrogenasa para el T0 y un tiempo medio del ensayo. Los valores representan medias ($n=4$) \pm desv. est. Dentro de cada columna, medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). C: control; CP: cama de pollo; BKS: bokashi; BRF: madera rameal fragmentada

| Actividad enzimática deshidrogenasa ($\mu\text{g TPF/g h}$) | | |
|---|--------------------|---------------------|
| Tratamiento | Día 0 | Día 30 |
| C | 9,01a \pm 1,37 | 3,17a \pm 0,2 |
| CP | 53,13b \pm 2,52 | 84,12b \pm 4,62 |
| BKS | 116,83c \pm 9,34 | 111,65c \pm 17,54 |
| BRF | 10,44a \pm 2,05 | 94,77bc \pm 21,34 |

TPF: 2,3,5-trifenilformazán

La medición de la enzima deshidrogenasa como indicador de actividad microbiana reveló que el tratamiento BKS fue aquel con mayor actividad tanto a las 12 horas (tiempo 0) como a los 30 días, lo cual da información sobre la actividad intrínseca de ese material. Fue

interesante el comportamiento de la ADH en BRF, dado que mostró una actividad inicial igual a la del suelo control (C) y 30 días después se detectó un aumento del 90% en la actividad lo cual evidencia su efecto bioestimulante. Además, para la misma fecha se observó -únicamente en este tratamiento- la aparición de hongos (imagen 4.7) de la pudrición blanca (o xilófagos) en la mezcla. La actividad en CP aumentó un 37% a los 30 días y fue siempre mayor que en el control.



Imagen 6: Foto del tratamiento suelo + BRF a los 30 días de comenzado el experimento en donde se observa micelio blanco cubriendo la mezcla.

4.3.4. Ensayo de fitotoxicidad

Los resultados del ensayo se resumen en el cuadro 4.6. Los valores expresados son porcentajes relativos al control con agua destilada. El porcentaje de elongación de radícula %E mostró que el extracto de CP inhibe la elongación respecto al control (A) en un 73%. También lo hacen el BRF y el BKS pero en menor medida. En todos ellos se observó ausencia de pelos radiculares menos en el extracto de suelo que no presentó diferencias apreciables

para esta variable en relación al control. La cama de pollo tuvo el menor porcentaje de germinación (%G) y este parámetro no fue lo suficientemente sensible para distinguir entre C, BKS y BRF. Estos dos últimos tratamientos se diferenciaron en la longitud del hipocótilo (%LH) y ninguno presentó inhibición. El porcentaje de longitud de hipocótilo presentó por un lado una inhibición marcada en el extracto de CP (imagen 4.8) y una estimulación para el caso de BKS y C.

Respecto al índice, según las clasificaciones de Zucconi et al. (1981) y Emino y Warman (2004), valores de IG menores a 50% indican alta fitotoxicidad como en el caso de CP; valores entre 50-80% indican moderada fitotoxicidad, entre los que estarían BKS y BRF, con valores cercanos al límite superior. Por último, valores mayores a 80% pueden considerarse como ausencia de fitotoxicidad, como es el caso del suelo de referencia.

Se midió el pH y la conductividad eléctrica (CE) de los extractos (cuadro 4.6). El análisis de correlación mostró una relación negativa entre la longitud de radícula (%LR) y la CE ($r = -0.86$; $p < 0.0001$).

Cuadro 4.6: Porcentajes de germinación de semillas (G), elongación de hipocotilo (E), longitud de radícula (LR), longitud de hipocotilo (LH) e Índice de germinación (IG) de *L. sativa* tratadas con extractos de diferentes enmiendas. Los datos representan media y error estándar ($n = 4$). Dentro de cada columna, valores seguidos con diferente letra son significativamente distintos ($p < 0,05$). C: control; CP: cama de pollo; BKS: bokashi; BRF: madera rameal fragmentada

| Tratamiento | %LR | %LH | %G | %E | IG | pH | CE (mS) |
|-------------|--------|---------|-------|--------|-------|------|------------|
| C (suelo) | 112,5a | 148,25a | 97,5a | 100,2a | 109,7 | 6,36 | 0,698 |
| CP | 26,9c | 39,85c | 80b | 62,6b | 21,52 | 7,6 | 5,38 |
| BRF | 79,5b | 112,05b | 97,5a | 100,5a | 77,5 | 6,43 | 2,83 |
| BKS | 75,6b | 177,50a | 100a | 102,8a | 75,6 | 8,48 | 4,57 |

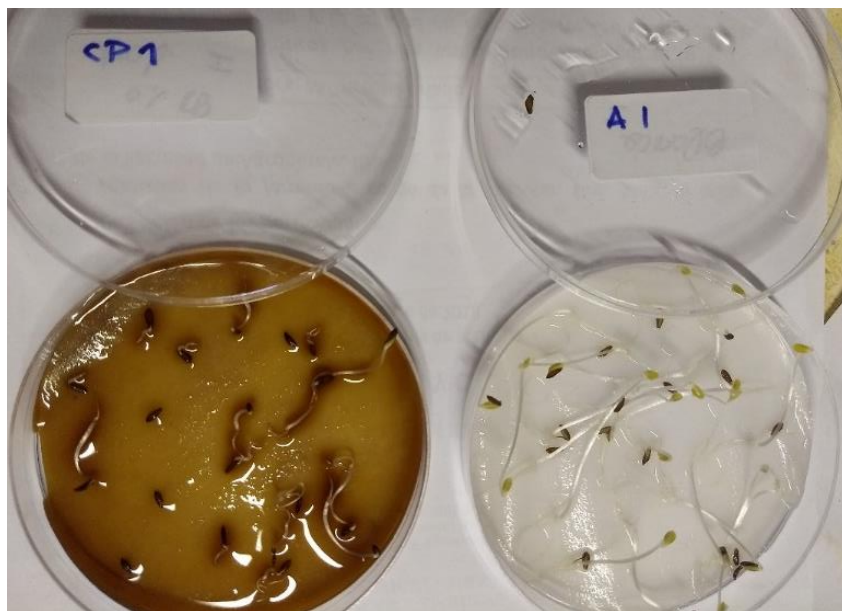


Imagen 4.8: Punto final del ensayo pasadas 120 horas. A la izquierda, el tratamiento con extracto de cama de pollo y a la derecha el tratamiento control con agua destilada.

4.4 Discusión

Al comparar con lo ocurrido en el Capítulo 3, la vida media de ambos plaguicidas en el suelo solo (C) fue mayor que la obtenida en suelo SR (inciso 3.3.2). Es decir, en el mismo suelo incubado bajo las mismas condiciones, lo único que cambió fue la dosis inicial. Este aumento en la dosis en el Capítulo 4 puede ser la explicación para observar mayores vidas medias, relación que Álvarez et al. (2013) han descrito para clorpirifos.

Los resultados del ensayo de bioestimulación en presencia de tres enmiendas orgánicas indican que el clorpirifos tuvo una menor vida media en suelo sin enmendar que en presencia de los BS; mientras que al endosulfán le ocurrió lo contrario. El mecanismo por el cual un mismo BS puede estimular la degradación de uno y retrasar la del otro será objeto de discusión en los siguientes párrafos.

En primer lugar, se han reportado trabajos respecto al clorpirifos y su afinidad por la materia orgánica (Li et al. 2005; Álvarez et al. 2013). La adición de enmiendas como residuos sólidos municipales o estiércol de vaca, tienen la capacidad de adsorber este insecticida y disminuir su concentración en la solución del suelo (Tejada et al. 2011; Zhao et al. 2017). Si bien la tendencia en los trabajos publicados es que las tasas de degradación aumentan respecto a suelos sin enmendar, Fenoll et al. (2011) registró que en suelo con estiércol, la vida media de clorpirifos aumentaba tres veces respecto a aquella en suelo solo. De igual modo, Zhao et al. (2017) realizaron un trabajo en el que se profundizó sobre los mecanismos de degradación de este plaguicida y se comprobó que, a mayor adsorción con la enmienda, menor concentración de clorpirifos en la fracción biodisponible, lo cual redujo las tasas de degradación. Al igual que lo encontrado por Zhao, y según lo observado en los resultados del presente ensayo, es factible que haya sucedido lo mismo en este caso. Otros trabajos

encontraron relaciones similares, como reportó Barriuso et al. (1997), la adición de compost disminuyó la mineralización de siete herbicidas; Pimmata et al. (2013) en el caso del carbofurán; Delgado-Moreno y Peña (2009) con herbicidas triazinas, Kadian et al. (2008) con la degradación de atrazina y Grenni et al. (2009) en el caso de linurón. Estos autores concluyeron que la aplicación simultánea de plaguicidas y el uso de enmiendas en suelo requieren de estudios preliminares que profundicen en la persistencia específica de cada compuesto y la eficacia de las enmiendas para acelerar la biodegradación. Este ensayo apuntó a responder esos interrogantes y en especial aportando datos con suelos representativos de la zona hortícola más importante del país.

En segundo lugar, se debe tener en cuenta que ésta fue una co-contaminación. En un trabajo de co-contaminación de herbicidas, Moorman et al. (2001) encontró que la atrazina en presencia de metolaclor se degradaba un porcentaje menor que la correspondiente aplicación individual. Se sabe que algunos de los productos de degradación son aún más tóxicos que sus compuestos parentales, y que podrían inhibir la degradación de otros contaminantes presentes en la mezcla (Kazunga y Aitken 2000). En el presente ensayo no se detectó el metabolito 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) derivado del clorpirifos que, según Anwar et al. (2009) tiene un efecto antimicrobiano que podría incluso impedir la propia degradación del compuesto parental, por lo que se descartó esta opción. En cambio para el endosulfán, sí se detectó su metabolito endosulfán sulfato en todos los microcosmos analizados. Es posible que éste al ser persistente y tóxico, afectara negativamente a los microorganismos capaces de descomponer clorpirifos, precisamente en aquellos tratamientos en que el endosulfán presentó mayores tasas de degradación. Sería deseable repetir el experimento aplicando los insecticidas en forma individual con el objetivo de corroborar esta inhibición. Sin embargo, es importante señalar que como resultado de las prácticas agrícolas,

los plaguicidas en suelo se hallan más frecuentemente en mezclas, permitiendo todo tipo de interacciones complejas, tanto entre ellos como con el propio con el suelo (Chu 2008).

Los resultados de la actividad enzimática deshidrogenasa como indicador correlativo de la actividad microbiológica permitieron distinguir entre tratamientos siendo el BKS el de mayor actividad, luego CP, BRF y por último el suelo sin enmienda (C). Estos resultados se explican por la alta actividad intrínseca que posee el BKS, que además de actuar como bioestimulante de la biota del suelo, aporta poblaciones de microorganismos activos provenientes del compost, del estiércol, y las propias levaduras. Similarmente, aunque sin el agregado de levaduras, ocurre con la cama de pollo compostada. La diferencia con el BRF es que éste no se aplicó como una enmienda fresca proveniente de material vivo y su fase de descomposición y disponibilidad de nutrientes (Lemieux 1996) sucedió durante el ensayo. Este hecho se ve reflejado en el aumento de la ADH, que a tiempo cero tenía un nivel inicial similar al del suelo (C) y 30 días después había alcanzado los valores encontrados para BKS (cuadro 4.5).

A su vez se observó la aparición del micelio blanco típico de hongos de la pudrición blanca. Estos organismos tienen la capacidad de transformar lignina y celulosa en compuestos de menor peso molecular, que luego quedan disponibles para el resto de la microbiota edáfica según lo reportado por Voběrková et al. (2017) quienes también registraron elevados niveles de actividad deshidrogenasa al inocular estos hongos en pilas de compost. Además de este efecto bioestimulador, se encontró mucha literatura con respecto a los hongos de la pudrición blanca y su capacidad de degradar compuestos orgánicos persistentes, entre ellos el endosulfán y el clorpirifos (Novontný et al. 1999; Kataoka y Takagi 2013; Gouma et al. 2019). Estos han sido en su mayoría ensayos en medio de cultivo

con degradaciones de más del 90% de endosulfán y casi un 70% de endosulfán sulfato por parte de *Trametes hirsuta* y *Phanerochaete chrysosporium*. Bisht et al. (2019) encontraron que en medio de cultivo *T. hirsuta* degradó el 100% de α - y β -endosulfán a los 15 días, y que la máxima degradación de clorpirifos fue 83% también a los 15 días por parte de *Cladosporium cladosporioides*, un hongo saprobio común en diferentes tipos de suelo, así como en material vegetal vivo o muerto. A raíz de estos hallazgos es que se puede pensar al BRF no solo como bioestimulante de la actividad microbiana sino como un posible inoculante de estos organismos con capacidad de degradar estos plaguicidas.

En cuanto a la prueba ecotoxicológica con semillas de lechuga, la longitud radicular (%LR) fue la variable más sensible para distinguir entre tratamientos, acorde con lo reportado por autores (Fuente et al. 2004; Young et al. 2016). El índice de germinación (IG) se emplea normalmente para evaluar la toxicidad de un cómpost, al combinar el efecto del extracto sobre la germinación (%G) y crecimiento de una planta (%LR) (Tam y Tiquia 1994). Como resultado de esta prueba, la cama de pollo fue la única enmienda con un valor de IG inferior a 20, lo cual indica alta fitotoxicidad según Zucconi et al. (1981). Una posible explicación para esto es la mayor conductividad eléctrica en relación con los otros BSs. La salinidad en este tipo de residuo suele ser elevada pero según cómo se lo trate (compost en pilas dinámicas o estáticas, con o sin aireación, con o sin riego), esta puede variar e incluso disminuir (Riera et al. 2014, Gange 2014). En el trabajo de Young et al. (2016) se confirmó que luego de tres meses de estabilización de este residuo, la toxicidad sobre semillas de lechuga disminuyó aunque el compost no alcanzó los valores guías para su uso como enmienda agrícola. En esta tesis el plazo de estabilización fue de 60 días, y la CP estuvo cubierta, no fue regada ni volteada, con lo cual basado en los trabajos mencionados se considera que aún se podría

disminuir la toxicidad de CP respecto a la salinidad. Además, en la caracterización de los BSs (cuadro 4.1) se observaron elevados niveles de cobre (Cu) y zinc (Zn) en CP, lo cual es frecuente y se lo atribuye a la dieta (Rutherford et al. 2003; Paterlini et al. 2017). Si bien estos no fueron medidos en el extracto utilizado en la prueba de germinación, es probable que una fracción soluble haya estado presente y que hayan contribuido con la fitotoxicidad de CP en semillas de lechuga (Cheung y Wong 1983; Jackson et al. 2003).

Puesto que las tasas de degradación de endosulfán con CP fueron elevadas, sería aconsejable realizar pruebas comparativas de este residuo con distintos estados de madurez y/o en mezclas con el fin de que esta sea una estrategia de biorremediación compatible con la agricultura.

PARTE B

4.5 Materiales y Métodos

4.5.1 Suelo

Para el ensayo de incubación se empleó el mismo suelo que en la parte A de este capítulo.

4.5.2 Plaguicida

Se utilizó el insecticida clorpirifos empleando el formulado comercial Senator®48 (48% clorpirifós) comercializado por Bayer CropScience (Madrid, España) y se preparó una solución con la dosis de aplicación máxima recomendada por el fabricante (5 L/ha). Los cálculos se hicieron en base al peso del suelo y su densidad aparente, lo cual resultó en un volumen de 0,34 µL de clorpirifos por frasco que fueron aplicados en solución con 65 mL de agua destilada, cantidad necesaria para llevar el suelo al 40% de su capacidad de campo.

4.5.3 Bioestimulantes

El okara puro (Op) fue provisto por la empresa española Soria Natural S.A. Las características de este subproducto se muestran en la Cuadro 4.7 en la sección de Resultados. Las determinaciones de materia orgánica, macro y micronutrientes así como la distribución de masa molecular proteica, se realizaron según la metodología descrita en Rodríguez-Morgado et al. (2015c).

Con el objetivo de obtener un bioestimulante a partir del okara puro, se realizó un proceso de hidrólisis en un biorreactor siguiendo la metodología pH Stat (Adler-Nissen 1977). Como agente hidrolítico se usó una endoproteasa proveniente de una fermentación líquida de *Bacillus lichiniformis* ATCC 21. En la figura 4.5 se muestra el esquema de la hidrólisis. Las metodologías de análisis fueron ya descriptas.

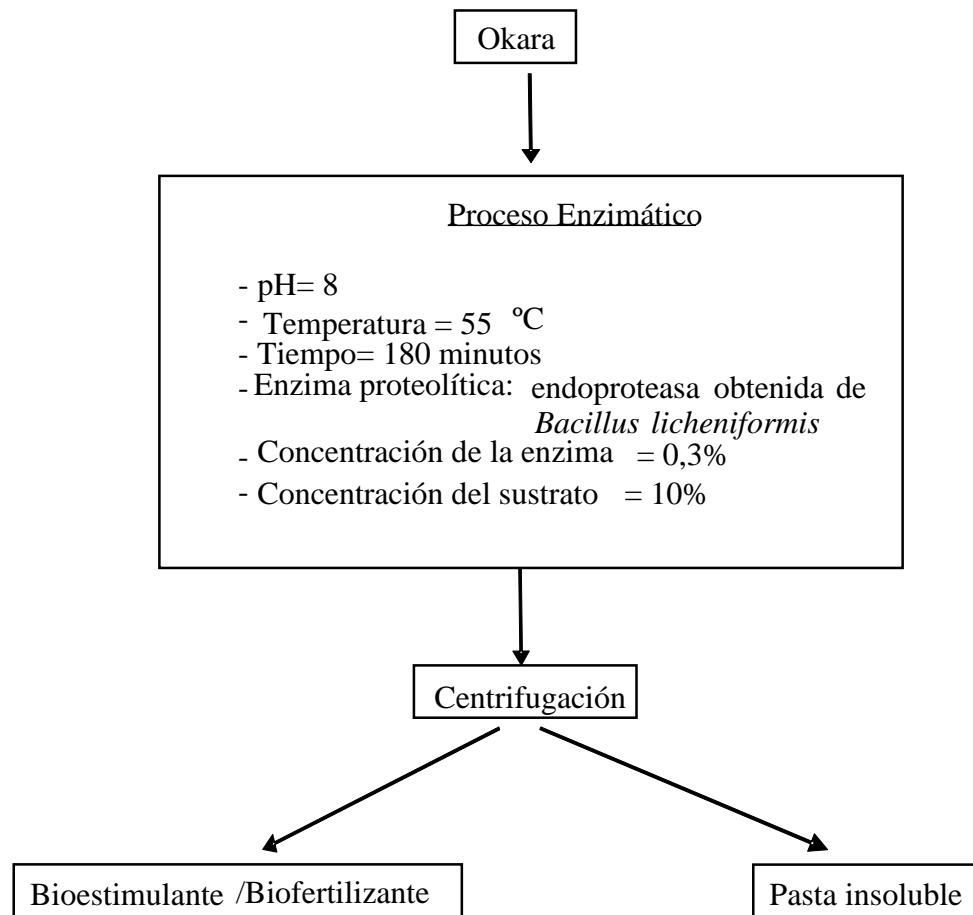


Fig.4.5: Proceso de hidrólisis enzimática empleada en la obtención de bioestimulante a partir de okara puro

4.5.4 Diseño del experimento

El experimento se condujo en las instalaciones de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica de Sevilla, España, entre 21 de abril y el 18 de julio de 2016. Consistió en un ensayo en microcosmos utilizando frascos de vidrio sin tapa en los que se pesaron 250 g de suelo.

Los bioestimulantes se aplicaron en dosis 1,5% p/p. El okara hidrolizado se aplicó en solución de agua destilada ($3,750 \pm 0,001$ g en 65 mL de agua) y el okara puro, seco y tamizado en una malla de 2mm se lo aplicó como polvo ($1,213 \pm 0,001$ g) (imágenes 4.9, 4.10, 4.11). En aquellos tratamientos que llevaban bioestimulante y clorpirifos, la solución de 65 mL de agua también contenía los 0,34 μ L de clorpirifos. Se agregó agua destilada a todos los suelos de modo de llevarlo al 60% de capacidad de campo, la humedad se controló gravimétricamente y se le agregó agua destilada cuando fue necesario. Todos los frascos se incubaron a 25 ± 1 °C. Los tiempos de observación se realizaron a los 3, 7, 15, 30, 50 y 80 días posteriores a la aplicación del insecticida. Los tratamientos, por triplicado, fueron:

C: Suelo Control

C + I: Suelo + Insecticida (Clorpirifos)

C + Oh: Suelo + okara hidrolizado

C + I + Oh: Suelo + Insecticida +okara hidrolizado

C + Op: Suelo + okara puro

C + I + Op: Suelo + Insecticida + okara puro



Imagen 4.9: Foto del bioestimulante en sus estados seco (puro) e hidrolizado.



Imagen 4.10: Microcosmos durante la aplicación de okara hidrolizado.



Imagen 4.11: Microcosmos durante la aplicación de okara puro y tamizado previa homogenización.

4.5.5 Análisis de plaguicidas

El clorpirifos en suelo se extrajo según la metodología de Menon et al. (2004) y su cuantificación se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), con detector UV a 240nm y una columna de fase reversa C18 ($4,6 \times 250 \text{ mm}^2$) a 25°C . Como fase móvil se utilizó hexano/diclorometano/metanol/2-propanol (80:15:0,2:4,8).

4.5.6 Actividad enzimática

En cada fecha se realizaron los siguientes análisis enzimáticos.

4.5.6.1 Actividad Deshidrogenasa

La actividad deshidrogenasa se midió por reducción del 2-*p*-iodofenil-3-*p*-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT) en iodonitrotetrazolio formazán (INTF) según García et al. (1993). Para ello se tomó 1 g de suelo y se le agregaron 0,2 mL de INT 4% y 0,4 mL de agua destilada. En forma simultánea se preparó un control de 1 g de suelo y 0,6 mL de agua destilada, ambos se incubaron en oscuridad durante 20 h a 20°C . El INTF formado se extrajo con 10 mL de metanol agitando la mezcla vigorosamente en vórtex durante 2 minutos. La solución final se

obtuvo por filtrado (imagen 4.12) y el INTF se midió con un espectrofotómetro UV-vis a 490 nm. Se preparó la curva de calibrado a partir de la cual se calculó la concentración final expresada en $\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.



Imagen 4.12: Etapa de filtrado del metanol en la técnica de Treyors modificada por García et al. 1993 de actividad deshidrogenasa. El color rojo se debe al INTF formado después de la incubación de suelo con INT, durante 20 horas en oscuridad

4.5.6.2 Actividad Ureasa

La actividad ureasa se determinó usando urea como sustrato (Kandeler y Gerber 1988). Para ello se pesó 1 g de suelo en tubo de ensayo y se lo mezcló con 4 mL de buffer de borato (pH 10) (Material Suplementario H) y 0,5 mL de urea 0,48%. Los controles se prepararon sin sustrato y los blancos de medición en ausencia de suelo. Todos los tubos se incubaron en baño a 37 °C y en agitación orbital continua por 2 horas. A continuación, se extrajo el amonio liberado en la incubación con 6 mL de KCl 7,4%, agitando durante 30 minutos. Luego de centrifugar la mezcla se tomó una alícuota de 0,5 mL y se le añadió 4,5 mL de agua destilada, 2,5 mL de salicilato sódico en hidróxido de sodio y 1 mL de dicloroisocianuro sódico. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad y luego se midió la

absorbancia a 690 nm (imagen 4.13 a). Se preparó la curva de calibrado a partir de la cual se calculó la concentración final expresada en $\mu\text{g NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$.

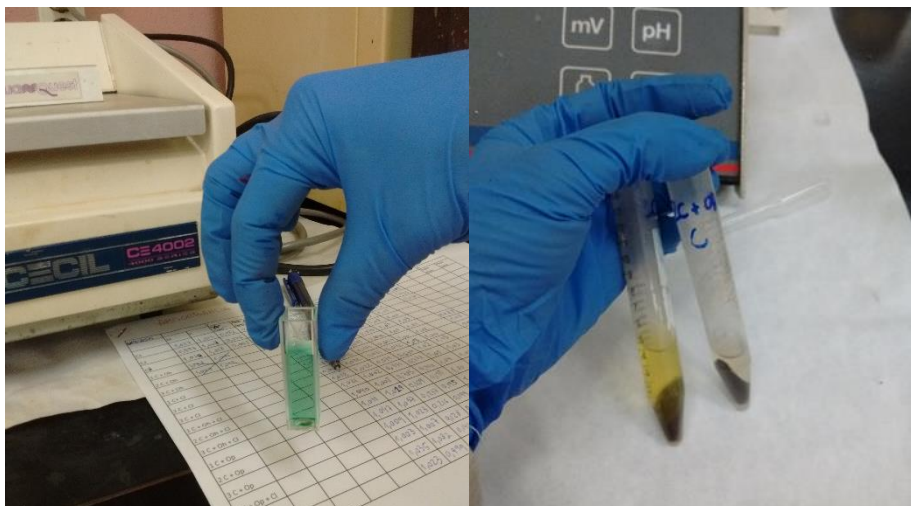


Imagen 4.13: a) (izq) Extracto de la técnica Kandeler y Gerber previo a la medición de su absorbancia. b) (Der) Extracto de reacción para la fosfatasa alcalina y su control sin sustrato. El método colorimétrico para medir *p*-nitrofenol se basa en el hecho que en solución alcalina este compuesto tiene color amarillo.

4.5.6.3 Actividad fosfatasa

La actividad fosfatasa alcalina se midió utilizando *p*-nitrofenilfosfato como sustrato (Tabatai y Brenner 1969). En un tubo de centrífuga se mezclaron 0,5 g de suelo con 2 mL de buffer universal modificado (MUB) a pH 11 (Material Suplementario H) y 0,5 mL de *p*-nitrofenilfosfato, y se llevaron a 37 °C en un baño de agua termostático con agitación continua durante una hora. Los controles se prepararon de la misma manera pero sin sustrato. Al concluir la hora todos los tubos se colocaron inmediatamente en hielo para detener la reacción enzimática. Se agregaron 0,5 mL de CaCl_2 (0,5M) y 2 mL de NaOH (0,5M), los tubos se centrifugaron y se midió la absorbancia del sobrenadante a 400 nm. El blanco de medición se hizo con todos los reactivos en ausencia de suelo (imagen 4.13 b). Se preparó la curva de calibrado a partir de la cual se calculó la concentración final expresada en $\mu\text{mol PNF liberado g}^{-1} \text{h}^{-1}$.

4.5.6.4 Actividad β -glucosidasa

La actividad β -glucosidasa se determinó con el método de Tabatabai (1982) y Eivazi y Tabatabai (1988) que se basa en la determinación colorimétrica del *p*-nitrofenol obtenido por acción de esta enzima. Se agregó como sustrato 0,5 mL de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (PNG) a 0,5 g de suelo. El medio de reacción fue MUB-HCl (0,1M) a pH 6 (Material Suplementario H). El resto del método es el mismo que el de la actividad fosfatasa alcalina, empleando la misma curva de calibrado.

4.5.7 Análisis estadístico

Los datos de degradación de clorpirifos se analizaron según lo descrito en el capítulo 3, inciso 3.2.6. Con los datos de actividad enzimática se realizaron ANOVA de dos vías, con el tiempo de observación y el tratamiento como factores, seguido de un test de Tukey para las comparaciones múltiples y considerando una probabilidad de significancia de 0,05. Se utilizó el paquete de software Statgraphics Plus 2.1

4.6 Resultados

4.6.1 Caracterización del bioestimulante

En el cuadro 4.7 se muestran las características de este nuevo bioestimulante (Oh) hecho a partir de okara puro.

Luego de la hidrólisis enzimática el Oh se caracterizó por tener mayores niveles de N, P y K, así como también de S y Zn. Respecto a la distribución de masas moleculares proteicas, la hidrólisis incrementó el porcentaje de proteínas con masas moleculares superiores a 300 daltons en un 56,1% mientras que disminuyeron aquellas proteínas entre 10000-5000 daltons y mayores a 10000 en un 63,3% y 58,8%, respectivamente.

Cuadro 4.7: Composición química y distribución de peso molecular proteico (media \pm desv.est., n = 3) del okara en sus dos estados. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

| | Op | Oh |
|--|------------------|-------------------|
| MO (%) | 53,7a \pm 14 | 44,8a \pm 18 |
| N (g kg ⁻¹) | 60,7a \pm 4,2 | 107,2b \pm 11,4 |
| P (g kg ⁻¹) | 6,5a \pm 1,7 | 11,8b \pm 2,2 |
| K (g kg ⁻¹) | 9,1a \pm 1,2 | 20,8b \pm 3,1 |
| S (g kg ⁻¹) | 3,8a \pm 1,1 | 11,8b \pm 1,4 |
| Ca (g kg ⁻¹) | 1,8a \pm 0,3 | 2,7a \pm 0,8 |
| Mg (g kg ⁻¹) | 2,1a \pm 0,8 | 3,3a \pm 1,0 |
| Fe (mg kg ⁻¹) | 63,9a \pm 4,9 | 63,4a \pm 5,7 |
| Cu (g kg ⁻¹) | 10,9a \pm 1,0 | 12,5a \pm 1,6 |
| Mn (g kg ⁻¹) | 30,6a \pm 2,2 | 27,2a \pm 1,9 |
| Zn (g kg ⁻¹) | 28,0a \pm 2,6 | 47,7b \pm 3,8 |
| Distribución de peso molecular proteico (Da) | | |
| >10000 | 1,7b \pm 0,5 | 0,7a \pm 0,1 |
| 10000 – 5000 | 64,0b \pm 10,5 | 23,5a \pm 2,8 |
| 5000 – 1000 | 1,2 \pm 0,2 | 0 |
| 1000 – 300 | 0 | 0 |
| < 300 | 33,2a \pm 6,4 | 75,7b \pm 10,6 |

4.6.2 Evolución del clorpirifos

En la figura 4.6 se puede ver la evolución de la concentración de clorpirifos en función del tiempo durante el ensayo. La degradación de este plaguicida se vio estimulada por el agregado de okara al suelo. Además se observaron diferencias en la degradación del insecticida según el estado de okara, siendo Oh la que provocó la mayor degradación de forma tal que al finalizar el ensayo este ya no fue detectable. En presencia de Op, la

concentración del insecticida a los 80 días fue 4 veces menor que el tratamiento C+I. Los datos cinéticos se presentan en el cuadro 4.8.

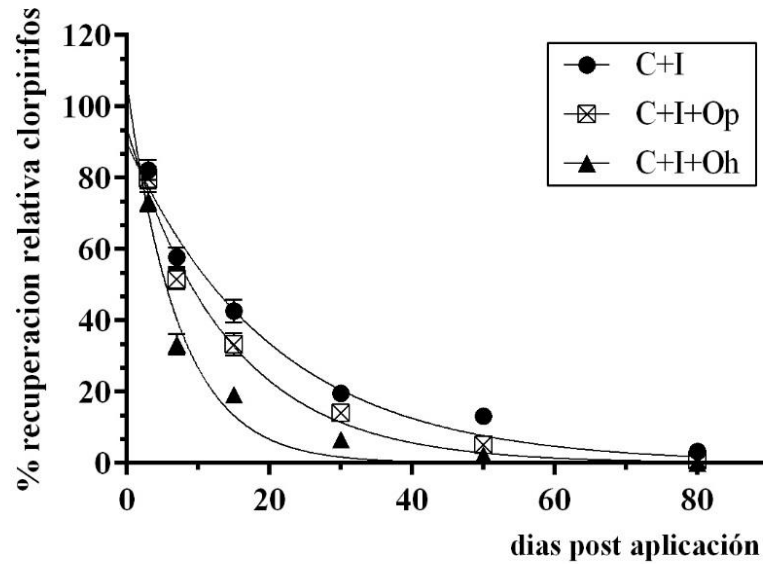


Fig. 4.62: Curvas de degradación de clorpirifos en suelo (C+I), en suelo con okara puro (C+I+Op) y en suelo con okara hidrolizado (C+I+Oh). Se grafican las medias de 3 observaciones con su desvío estándar, y la función de ajuste exponencial decreciente para todos los tratamientos.

Cuadro 4.8: Datos cinéticos de las curvas de degradación de clorpirifos. Los valores representan medias (n=3). Vidas medias con una letra distintas son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

| Clorpirifos | C+I | C+I+Op | C+I+Oh |
|---------------------|---------------|--------------|-------------|
| R^2 | 0,98 | 0,98 | 0,96 |
| $t_{1/2}$ | 14,08a | 9,88b | 5,00c |
| IC 95% de $t_{1/2}$ | 12,25 a 16,56 | 8,66 a 11,50 | 4,11 a 6,38 |
| k | 0,05 | 0,07 | 0,14 |

4.6.3 Propiedades bioquímicas del suelo

El agregado de bioestimulantes al suelo provocó el aumento significativo de la actividad deshidrogenasa (Cuadro 4.9), sin embargo este incremento no fue igual para Oh que para Op. Al aplicar Op se observó un aumento gradual de la actividad durante el ensayo de modo que al día 80 había aumentado un 81 % respecto al suelo control (C). Por otro lado el Oh provocó un aumento máximo (96 %) al día 7 y luego disminuyó paulatinamente hasta alcanzar valores similares a los del tratamiento C hacia el final del ensayo.

Al comparar actividad deshidrogenasa entre C y aquellos tratamientos con insecticida, se observó que la actividad se inhibió; sin embargo esta inhibición duró hasta el día 30, momento en que la actividad tuvo su mínimo y luego comenzó a recuperarse lentamente hasta el final del ensayo.

En los tratamientos con Op y Oh al suelo con insecticida la inhibición de la actividad deshidrogenasa fue menor. Aun así este efecto no fue independiente del tipo de bioestimulante. Si se compara con C+Op, la actividad en presencia de Op e insecticida (C+Op+I) fue 28,4% menor al final del ensayo. En el caso de C+Oh+I, también hubo un máximo a los 7 días de aplicar pero este valor fue 35,1% menor que C+Oh. Luego de ese pico, la actividad disminuyó gradualmente y hacia el final del ensayo alcanza valores similares a los de suelo control.

La actividad ureasa también varió su comportamiento según la fuente de materia orgánica con la que se enmendó el suelo (Cuadro 4.9). Al comparar C+Op con el tratamiento C, cuando se aplicó Op la actividad aumentó progresivamente hasta el final del ensayo superándola en un 79,1%; sin embargo al aplicar Oh esta actividad no se vio estimulada. Cuando se aplicó clorpirifos al suelo la actividad disminuyó, llegando a un mínimo en el día 30 luego de la aplicación. El comportamiento de esta enzima en el

tratamiento C+I fue similar a lo obtenido en C+Oh+I. Por otro lado los resultados para C+Op+I mostraron una disminución en la actividad hacia el final del ensayo de un 32,8% respecto a C+Op.

Cuadro 4.9: Evolución de la actividad enzimática deshidrogenasa (ADH) y actividad ureasa (media \pm d.st, n = 3) en suelo con adición de okara puro, hidrolizado y/o clorpirifos durante el ensayo. Dentro de cada columna, valores seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). C: suelo; I: insecticida; INTF: 2-*p*-iodo-3-nitrofenil formazán

| Días | 3 | 7 | 15 | 30 | 50 | 80 |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|
| ADH ($\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$) | | | | | | |
| C | 1,6b \pm 0,2 | 1,5b \pm 0,3 | 1,5b \pm 0,2 | 1,4b \pm 0,2 | 1,5b \pm 0,2 | 1,4b \pm 0,2 |
| C+Op | 3,2c \pm 0,9 | 3,9c \pm 1,2 | 4,7c \pm 1,4 | 5,1c \pm 1,3 | 6,0d \pm 1,5 | 7,4d \pm 1,2 |
| C+Oh | 28,9e \pm 3,5 | 36,8e \pm 2,7 | 30,8e \pm 3,0 | 9,7d \pm 1,8 | 1,4b \pm 0,2 | 1,3b \pm 0,3 |
| C+I | 0,9a \pm 0,1 | 0,7a \pm 0,1 | 0,6a \pm 0,1 | 0,6a \pm 0,1 | 0,7a \pm 0,1 | 1,1ab \pm 0,2 |
| C+Op+I | 2,3c \pm 0,5 | 2,8c \pm 0,7 | 3,6c \pm 0,9 | 4,0c \pm 1,4 | 4,5c \pm 1,4 | 5,3d \pm 1,8 |
| C+Oh+I | 20,1e \pm 1,6 | 23,9e \pm 2,2 | 17,1d \pm 1,6 | 2,9c \pm 0,8 | 1,4b \pm 0,2 | 1,5b \pm 0,2 |
| Actividad ureasa ($\mu\text{g NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$) | | | | | | |
| C | 1,6b \pm 0,2 | 1,5b \pm 0,3 | 1,5b \pm 0,2 | 1,6b \pm 0,3 | 1,4b \pm 0,2 | 1,4b \pm 0,3 |
| C+Op | 2,0b \pm 0,3 | 2,4b \pm 0,5 | 2,8b \pm 0,7 | 3,9c \pm 0,6 | 5,0c \pm 1,0 | 6,7d \pm 1,2 |
| C+Oh | 1,8b \pm 0,3 | 1,9b \pm 0,3 | 1,6b \pm 0,1 | 1,7b \pm 0,3 | 1,8b \pm 0,3 | 1,5b \pm 0,2 |
| C+I | 1,1a \pm 0,1 | 0,8a \pm 0,1 | 0,7a \pm 0,1 | 0,7a \pm 0,0 | 0,8a \pm 0,1 | 1,2ab \pm 0,1 |
| C+Op+I | 1,5b \pm 0,2 | 1,7b \pm 0,2 | 2,1b \pm 0,4 | 2,6b \pm 0,3 | 3,4c \pm 0,6 | 4,5c \pm 0,8 |
| C+Oh+I | 1,2ab \pm 0,2 | 0,8a \pm 0,1 | 0,7a \pm 0,1 | 0,9a \pm 0,1 | 1,4b \pm 0,2 | 1,4b \pm 0,2 |

La actividad β -glucosidasa en suelo con Oh también tuvo un máximo en el día 7 de aplicada la enmienda, mientras que en C+Op la mayor actividad enzimática se registró al final del ensayo (cuadro 4.10). La aplicación de clorpirifos (C+I) tuvo un efecto inhibitorio sobre esta enzima que se mantuvo hasta el día 30, fecha en que se observó la máxima inhibición. Cuando se analizó la actividad en presencia de insecticida y enmienda Op el comportamiento fue el mismo que en C+Op, es decir incrementa la actividad en el tiempo, con la diferencia que al finalizar el ensayo C+Op+I fue un 50% menor. Por otro

lado, tal como sucedió en C+Oh el tratamiento C+Oh+I tuvo un máximo de actividad al día 7 pero con un 40% menos de actividad. Hacia el final del ensayo la actividad equiparó a la del suelo control.

Por último, el comportamiento de la actividad fosfatasa fue similar al de la β -glucosidasa para todos los tratamientos.

Cuadro 4.10: Evolución de la actividad β -glucosidasa y fosfatasa (media \pm d.st, n = 3) en suelo con adición de okara puro, hidrolizado y/o clorpirifos durante el ensayo. Dentro de cada columna, valores seguidos por la misma letra(s) no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). C: suelo; I: insecticida; PNP: *p*-nitrofenol.

| Días | 3 | 7 | 15 | 30 | 50 | 80 |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Actividad β -glucosidasa (mmol PNP g ⁻¹ h ⁻¹) | | | | | | |
| C | 0,56b \pm 0,12 | 0,53b \pm 0,09 | 0,51b \pm 0,11 | 0,52b \pm 0,11 | 0,49b \pm 0,16 | 0,48b \pm 0,17 |
| C+Op | 0,71b \pm 0,18 | 0,85c \pm 0,16 | 1,0c \pm 0,1 | 1,8c \pm 0,2 | 2,4d \pm 0,3 | 3,0d \pm 0,8 |
| C+Oh | 1,8c \pm 0,2 | 2,5d \pm 0,4 | 2,0d \pm 0,2 | 1,7c \pm 0,2 | 0,48b \pm 0,11 | 0,51b \pm 0,11 |
| C+I | 0,34a \pm 0,09 | 0,29a \pm 0,07 | 0,25a \pm 0,05 | 0,23a \pm 0,06 | 0,32a \pm 0,08 | 0,41b \pm 0,15 |
| C+Op+I | 0,49b \pm 0,14 | 0,61b \pm 0,15 | 0,75b \pm 0,18 | 0,85c \pm 0,14 | 0,99c \pm 0,12 | 1,5c \pm 0,1 |
| C+Oh+I | 1,1c \pm 0,1 | 1,5c \pm 0,2 | 1,0c \pm 0,1 | 0,74 \pm 0,11 | 0,51b \pm 0,14 | 0,49b \pm 0,12 |
| Actividad fosfatasa (μ mol PNP g ⁻¹ h ⁻¹) | | | | | | |
| C | 1,9b \pm 0,3 | 1,7b \pm 0,3 | 1,9b \pm 0,4 | 1,8b \pm 0,2 | 1,8b \pm 0,2 | 1,8b \pm 0,3 |
| C+Op | 3,9c \pm 0,8 | 5,1c \pm 1,6 | 6,3c \pm 2,0 | 7,0d \pm 1,8 | 8,1d \pm 2,3 | 9,3d \pm 1,5 |
| C+Oh | 6,7c \pm 1,6 | 10,4d \pm 2,4 | 8,3d \pm 2,1 | 3,2b \pm 0,8 | 1,7b \pm 0,2 | 1,6b \pm 0,2 |
| C+I | 1,2a \pm 0,2 | 0,97a \pm 0,15 | 0,81a \pm 0,17 | 0,78a \pm 0,16 | 0,98a \pm 0,19 | 1,3a \pm 0,2 |
| C+Op+I | 2,7b \pm 0,7 | 3,4b \pm 0,9 | 4,2c \pm 1,1 | 4,9c \pm 1,0 | 5,2c \pm 1,1 | 6,4c \pm 1,3 |
| C+Oh+I | 4,8c \pm 1,6 | 7,1d \pm 1,8 | 5,9c \pm 1,6 | 2,8b \pm 0,7 | 1,8b \pm 0,3 | 1,6b \pm 0,2 |

4.7 Discusión

Los resultados de este ensayo concuerdan con lo encontrado por Romyen et al. (2007), Kadian et al. (2012) y Tejada et al. (2011b, 2014). En todos los casos mencionados, el agregado de enmiendas con distintos orígenes: agrícolas, industriales, municipales, etc. aceleró la descomposición de clorpirifos bajando así la concentración total de este en suelo y permitiendo la recuperación de la biota microbiana a un estado similar al previo de la contaminación.

Aquí, la aplicación de enmienda de okara al suelo contaminado tuvo un efecto similar al descrito por los autores mencionados, por lo que se puede deducir que esta fuente es útil como estrategia de biorremediación de suelos impactados con clorpirifos. Este bioestimulante sin embargo varió en su efecto según el tratamiento previo. Cuando se lo aplicó puro (Op) el clorpirifos se degradó más lentamente que cuando se aplicó en forma de hidrolizado (Oh), sugiriendo que su poder bioestimulante sí depende del modo en que se lo aplique sobre el suelo.

Se postula entonces que el hidrolizado con su alto contenido en proteínas de bajo peso molecular (<300 daltons) sirvió como fuente de consumo rápida para los microorganismos. Las elevadas actividades enzimáticas durante los primeros tiempos de observación señalan una rápida proliferación de microorganismos que a su vez coincide con una degradación mayor del insecticida, llevándolo a niveles no detectables en el día 80. Estos resultados concuerdan con lo hallado por Tejada et al. (2014) cuando evaluó hidrolizados de barros cloacales y plumas de pollo. Por otra parte, el Op con sus proteínas de alto peso molecular no fue asimilado con tanta facilidad por los microorganismos del suelo debido a que primero deben romper esas macromoléculas. La mineralización sucede, pero de modo más lento y esto lo confirman los valores crecientes de actividad enzimática hacia el final del ensayo.

Además, en este estudio se observó que la aplicación de este insecticida al suelo provocó una disminución inmediata y significativa de las actividades enzimáticas evaluadas. Estos resultados se hayan en concordancia con otros como Shan et al. (2006), Tejada et al. (2011b, 2014), Kadian et al. (2012), y Sánchez-Hernández et al. (2017), que han encontrado que la aplicación de clorpirifos afecta negativamente las propiedades biológicas del suelo.

4.8 Conclusiones generales

Las enmiendas propuestas funcionaron como bioestimulantes de la comunidad microbiana, como lo evidencia la actividad enzimática, siendo el efecto de esta estimulación sobre la degradación de los plaguicidas diferente entre ellos, evidenciando un efecto selectivo en el par enmienda/plaguicida.

La aplicación de BKS y CP fue la más efectiva para acelerar la degradación de endosulfán, pero la fitotoxicidad relativa entre ellas y la bibliografía que advierte sobre los riesgos del uso de CP, hace que BKS sea una propuesta más segura en términos agrícolas y ambientales. A corto plazo, el BRF no fue efectivo para bioestimar la degradación de los insecticidas a pesar de tener el mayor porcentaje de MO. Sin embargo, a los 120 días la degradación de los insecticidas fue comparable con la de BKS y CP, por lo que sería interesante un experimento de mayor duración para evaluar a BRF. Por último, se debe tener en cuenta la acumulación de metabolitos persistentes, en el caso particular del endosulfán este no se alcanzó a mineralizar por completo en la escala de tiempo del estudio.

Respecto a clorpirifos estos tratamientos retrasaron su mineralización y por otro lado, el experimento con okara demostró que su adición fue efectiva en la bioestimulación e incluso mitigó los efectos tóxicos del clorpirifos sobre la actividad microbiana. Los

mayores efectos biorremediadores de este producto ocurrieron cuando se transformó el okara mediante hidrólisis enzimática y se obtuvo un nuevo bioestimulante rico en proteínas de bajo peso molecular y fácilmente asimilado por microorganismos del suelo. Estos resultados ponen de manifiesto la gran variabilidad de la persistencia del clorpirifos, por lo que es recomendable usar estrategias de remediación diseñadas específicamente para mitigar los efectos tóxicos del mismo.

Otro aporte novedoso de este capítulo es la caracterización de BRF y BKS puesto que no se conocen trabajos que hayan ensayado estos materiales con este propósito, y existe poca literatura científica que los describa.

Capítulo 5. Evaluación de un cultivo energético como potencial especie fitorremediadora de suelo impactado con endosulfán

5.1 Introducción

El uso extensivo de plaguicidas en la agricultura tiene como objetivo principal cumplir con los requisitos alimentarios del crecimiento poblacional mundial. El endosulfán es un insecticida que fue usado durante cinco décadas en todo el mundo para combatir una amplia gama de insectos en diversos cultivos extensivos e intensivos como café, cereales, frutales y algodón. Sin embargo, en la actualidad tanto sus residuos como sus productos de degradación persisten en el ambiente. Además, estos productos pueden ser absorbidos desde el suelo tanto por plantas silvestres como por vegetales cultivados (Ramírez-Sandoval et al. 2011; Singh y Singh 2014; Somtrakoon, Kruatrachue y Lee 2014; Mitton et al. 2016), representando un riesgo no solo para la vida silvestre sino también la salud humana.

Si bien su uso fue prohibido en muchos países, aún quedan niveles residuales en zona agrícolas y en altas concentraciones en zonas de almacenamiento, producción y carga del mismo, así como también se lo ha detectado en todos los compartimentos del ambiente, convirtiéndose en un contaminante a escala global (Weber et al. 2010). Por esta razón, la descontaminación de sitios impactados con plaguicidas persistentes es causa de preocupación debido a su impacto en la cadena alimenticia. Los tratamientos físico-químicos tradicionales para la remediación de plaguicidas de sitios contaminados son costosos, requieren mucha mano de obra y en muchos casos involucra el tratamiento y/o disposición final de residuos (Morillo y Villaverde 2017). Por lo tanto, surge con mayor fuerza la idea de investigar y desarrollar tecnologías ecológicas y eficientes para la remediación de suelo contaminado con plaguicidas persistentes y tóxicos.

Una estrategia para la descontaminación de suelos es la fitorremediación, es decir, el uso de plantas para biorremediar un entorno, y se basa en los mecanismos fisiológicos y bioquímicos de la propia planta o de los microorganismos asociados a su raíz (rizósfera)

(Pivetz 2001; Fan et al. 2008). Como se mencionó antes, algunas plantas pueden absorber endosulfán y/o sus metabolitos, disminuyendo así la concentración del contaminante en el ambiente. Al momento de elegir la planta fitorremediadora, se debe prever que pueda crecer bien en suelos con plaguicidas organoclorados puesto que hay reportes que indican fitotoxicidad frente a este producto (Pérez et al. 2008; Chouychai 2012). Además, es deseable que dichas plantas tengan bajos requerimientos nutricionales, tolerancia a un amplio rango de condiciones ambientales y un rápido crecimiento.

En este trabajo se propone evaluar a *Miscanthus x giganteus* (*M x g*) como planta fitorremediadora. Esta planta es una gramínea C4 perenne originaria de Asia, y es un híbrido entre la especie tetraploide *M. sacchariflorus* y la diploide *M. sinensis* (Deuter 2000). Es estéril, lo que limita su potencial como especie invasiva; puede crecer en suelos pobres, de baja calidad y contaminados (Lewandowski y Schmidt 2006). Se la cultiva debido a su rápido crecimiento y acumulación de biomasa para su aprovechamiento energético, para la construcción y para fines agrícolas (Nsanganwimana et al. 2014). Su biomasa ofrece un amplio rango de productos finales según el método de transformación que se utilice (figura 5.1) y dado el creciente interés en energías renovables y químicos de origen vegetal, el género *Miscanthus* se ha vuelto de interés para diferentes industrias (Brosse et al. 2012)

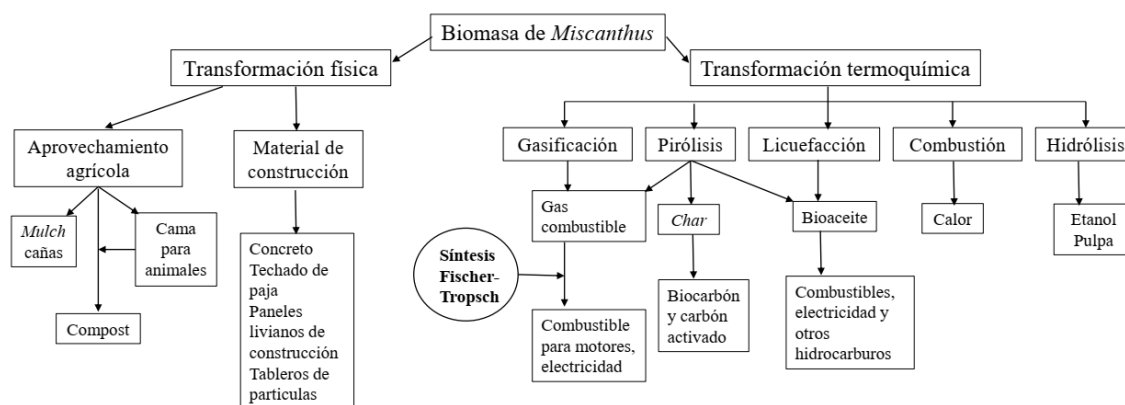


Fig. 5.13. Esquema de los procesos de aprovechamiento de la biomasa de *Miscanthus* (tomado de Nsanganwimana et al. 2014)

En cuanto a usos potenciales como fitorremediadora, la literatura existente es poca y se ha referido mayormente a metales pesados. Este cultivo tiene la capacidad de secuestrar elementos traza y acumularlos en raíces, rizomas, tallos y hojas (Wanat et al. 2013; Kocoń y Jurga 2016). Por otro lado, se sabe que los contaminantes orgánicos son mayormente degradados por microorganismos y que ciertas plantas; aumentan el suministro de oxígeno y nutrientes en la interfaz suelo-raíz; estimulan el crecimiento y diversidad microbiana, y por lo tanto su capacidad degradadora (Reichenauer y Germida 2008). En este aspecto, Técher et al. (2012) realizaron un experimento en medio líquido con cultivos bacterianos y encontraron que los exudados radiculares de *M x g* estimulaban a los microorganismos induciendo la degradación de compuestos orgánicos persistentes. Sin embargo, hasta la fecha no se ha ensayado su efecto directamente en suelo -con la complejidad que eso conlleva-, ni tampoco su potencial como fitorremediadora de endosulfán.

5.1.1 Objetivo

Los objetivos de este estudio fueron:

Evaluar la velocidad de descomposición del endosulfán en un suelo de la zona hortícola platense en condiciones semi-controladas.

Evaluar a *M x g* como potencial especie fitorremediadora a través de la disipación de endosulfán y su relación con variables bioquímicas del suelo.

5.1.2 Hipótesis

La hipótesis de este capítulo es que el desarrollo de la raíz de *M x g* favorecerá la degradación de endosulfán en suelo a través del fenómeno conocido como rizodegradación.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Suelo

El suelo utilizado provino de un claro de uso recreativo, dentro de una reserva en la zona de La Plata (Parque Pereyra Iraola) sin historia de aplicación de plaguicidas y clasificado como un Argiudol vértico. Se tomó una muestra compuesta de los primeros 0-20 cm empleando una pala, se lo secó al aire y se lo tamizó con una malla de 2mm. Sus características físicoquímicas se detallan en el cuadro 3.2 del inciso 3.3 como SR.

5.2.2 Plantas

Para aquellos tratamientos con planta se partió de rizomas activos de *M x g* provenientes del campo experimental de FAUBA bajo supervisión de SENASA. Los rizomas se desenterraron en primavera que es cuando hay yemas jóvenes, a una profundidad promedio de 5 cm, utilizando pala manual. Se los lavó, se los pesó (imagen 5.1) y se seleccionaron en función de su peso ($5,6 \pm 0,3$ g), luego se mantuvieron en arena húmeda a temperatura ambiente hasta obtener los primeros brotes (técnica de micropropagación). Para el paso siguiente se seleccionaron los rizomas activos.



Imagen 5.17: Selección de rizomas de *M x g* previo al ensayo.

5.2.3 Plaguicida

Se utilizó endosulfán marca comercial Thionex® EC, 35%p/v (Makhteshim) y se aplicó la dosis máxima recomendada por el fabricante (3 L/ha). Los cálculos se hicieron en base a la densidad del suelo y resultó en una concentración inicial de 0,315 mg endosulfán /kg suelo en cada maceta.

5.2.4 Diseño del experimento

El ensayo se realizó entre noviembre 2016 y mayo 2017 en las instalaciones de la Cátedra de Fertilidad de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA). El suelo se distribuyó en macetas en porciones de 500 g. Se asignaron al azar los cuatro tratamientos: Con planta (P), con planta y endosulfán (P+E), con endosulfán (E) y el control suelo sin planta y sin endosulfán (sP/sE). Cada uno tuvo cuatro réplicas y en total se obtuvieron 112 unidades experimentales.

Las macetas se ubicaron en invernáculo cuidando que la distribución de las mismas sobre las mesas fuese aleatoria (imagen 5.2). Los tiempos de observación (muestreo destructivo) se realizaron a los 6, 30, 60, 85, 110, 140, 155 días. En cada fecha se procedió a cosechar la planta entera, la parte aérea por un lado y las raíces y rizoma por otro. Para esta última tarea, se tamizó todo el suelo de la maceta y con ayuda de pinzas se separaron las raíces, por último, se lavaron y se dejaron secar sobre papel absorbente (imagen 5.3). La biomasa vegetal se llevó inmediatamente a estufa a 70 °C por 48 h, luego de las cuales se registró el peso seco. El total del suelo de cada maceta se volcó en bandejas de aluminio para su homogenización, cuarteo y muestreo. De cada una se tomaron 20 g para el análisis de endosulfán, y aproximadamente 80 g se guardaron para análisis bioquímicos.

Durante el ensayo las macetas se regaron con agua de red, controlando por pesada que el suelo estuviera al 60% de su capacidad de campo. Las condiciones de luz y

temperatura fueron las del invernáculo, la temperatura una media de 23,1 °C un rango de 8,2-35,6 °C durante todo el periodo.



Imagen 5.2: Ensayo de macetas en invernáculo en la Cátedra de fertilidad con $M \times g$

5.2.5 Análisis de plaguicida

Todos los análisis se realizaron por cromatografía gaseosa acoplada a un detector de captura de electrones (CG-EDC), la extracción y el método de detección se describió en el capítulo 2, inciso 2.2.3. La curva de calibrado se presenta en el Material Suplementario I.

5.2.6 Variables bioquímicas

5.2.6.1 Respiración microbiana del suelo (RB)

La RB midió según lo descrito en 3.2.5.1.

5.2.6.2 Actividad deshidrogenasa (ADH)

La medición de esta actividad enzimática se realizó según lo descrito en capítulo 3, inciso 3.2.5.3. Se midió previo a la aplicación y luego a los 6, 30, 85 y 140 días posteriores a la aplicación. En las primeras dos fechas se omitió el análisis de los tratamientos con planta (P y P+E) porque los rizomas no estaban plantados o eran muy recientes. A los 6 días únicamente se midió el tratamiento E ya que se deseaba detectar impactos del endosulfán en la ADH.

5.2.7 Análisis estadístico

Los datos de degradación de endosulfán se ajustaron mediante regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.01 para Windows (GraphPad Software, CA USA). Los datos de variables bioquímicas se analizaron mediante ANOVA. Los análisis de varianza (ANOVA) correspondientes y el test de comparaciones múltiples LSD de Fisher se realizaron con el programa Infostat (Di Rienzo et al. 2014).

5.3 Resultados

5.3.1 Planta fitorremediadora

En cuanto al desarrollo de *M x g* en invernáculo se presentan en esta sección los datos de biomasa aérea y raíces. Según el ANOVA no hubo diferencias en el rendimiento de la planta en presencia o ausencia de endosulfán. Por ese motivo se grafica el rendimiento de *M x g* en el tiempo como un solo grupo. Las raíces tuvieron un crecimiento sostenido mientras que la biomasa aérea detuvo su crecimiento a los 110 días coincidente con el cambio de estación de verano a otoño (Figura 5.2).

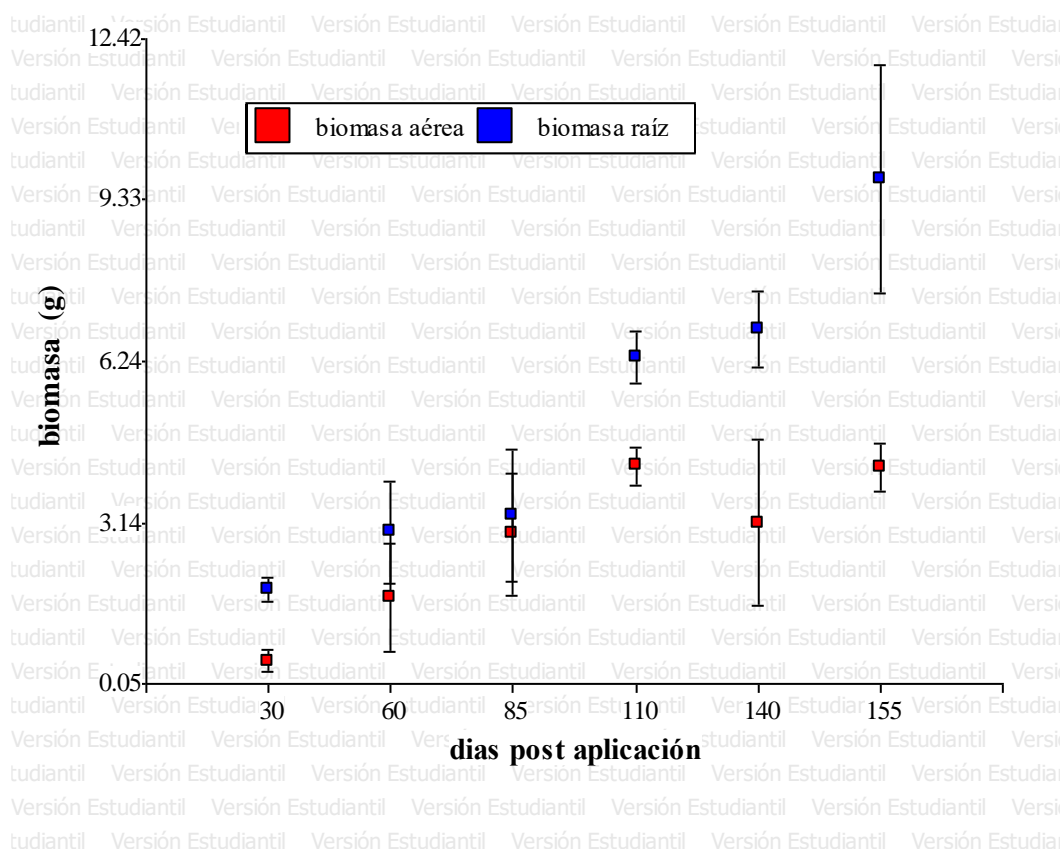


Fig. 5.2: Rendimiento de *M x g* en macetas durante el ensayo. Aclaración: Se incluyeron datos de biomasa hasta los 155 días de duración del ensayo, pero no se analizó el suelo en busca de plaguicidas en esa fecha.

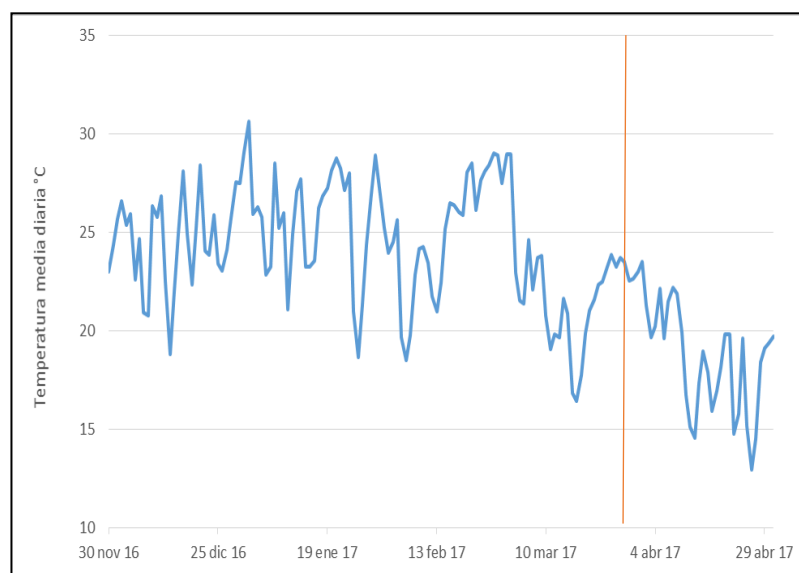


Fig. 5.34: Temperatura media diaria registrada durante el ensayo. La línea roja señala el cambio de estación. Los datos provistos por el Servicio Meteorológico Nacional (SMN) y procesada por la Cátedra de Climatología y Fenología Agrícola de la Facultad de Agronomía (FAUBA).



Imagen 5.3: Rizomas y raíces de *M. x. g.* cosechados a los 110 días de comenzado el ensayo, previo al secado en estufa.

5.3.2 Endosulfán

En la figura 5.4 se puede ver la evolución del endosulfán durante el ensayo. La degradación de este plaguicida no se vio afectada por la presencia de *M. x. g.* y el resultado de una prueba de F (0,05; $p = 0,95$) arrojó que los datos pueden ser explicados con una única función o curva. El tiempo de vida media, cuando se estableció un plateau igual a cero, fue de 76,3 días (IC%95= 66,7 a 89,2) y su constante $k = 0,009$. Sin embargo, se observó que el porcentaje de recuperación de endosulfán fue prácticamente el mismo en las últimas tres fechas. Se ajustaron los datos al modelo exponencial decreciente sin restricción y el resultado fue un plateau al 36% de recuperación.

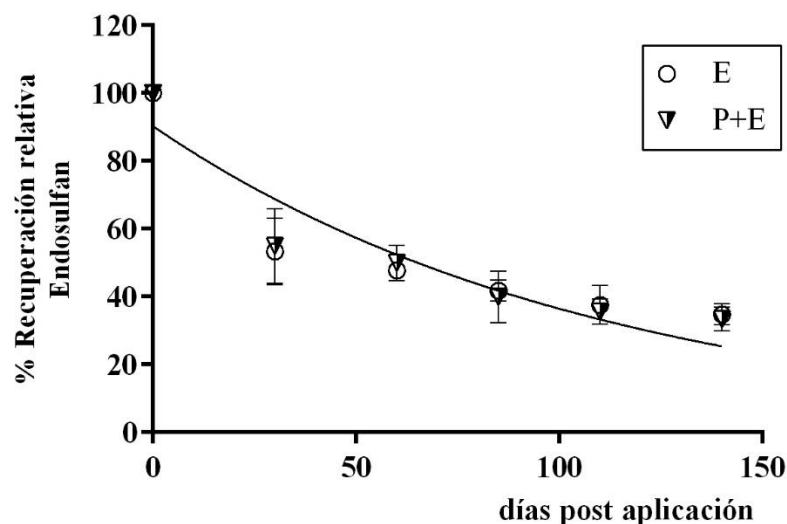


Fig. 5.4: Curva de disipación de endosulfán total en macetas con endosulfán (E) y con endosulfán y *M x g* (P+E). Se grafican las medias de 4 observaciones con su desvío estándar, y una única función de ajuste exponencial global y decreciente ($R^2=0,82$).

Isómeros α - y β -endosulfán

Se obtuvieron las curvas de calibrado experimentales para cada isómero con ajustes de 0,99 (R^2) y luego se calcularon las concentraciones obtenidas durante el ensayo. En la Figura 8 se expresa el cambio en la relación de estos isómeros (α/β) en función del tiempo. Se puede observar que primero se disipa el isómero α , indicando que el isómero β es el más persistente. A su vez se observó que en presencia de planta hay mayor degradación del isómero α hacia los últimos días del ensayo, aunque esta diferencia no fue lo suficientemente importante en los plazos del ensayo como para detectarlo con significancia $<0,05$.

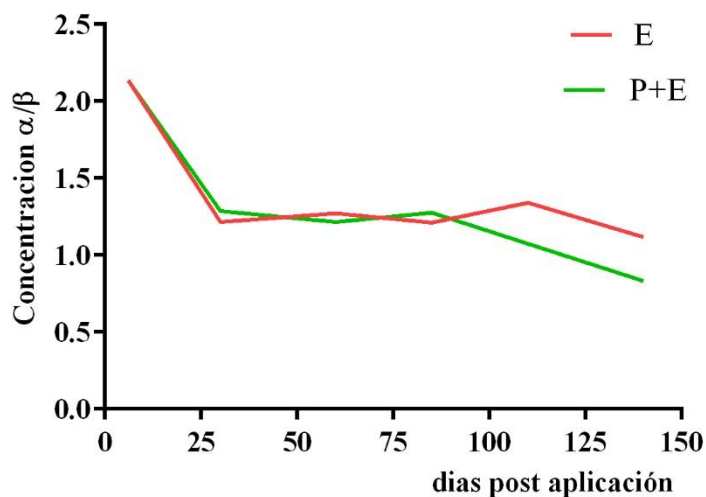


Fig. 5.5: Cociente de concentración de α y β -endosulfán durante el ensayo.

5.3.3 Variables bioquímicas

5.3.3.1 Respiración basal

La respiración basal tuvo un comportamiento similar en los cuatro tratamientos: un descenso de la actividad hasta el día 60 y luego se mantuvo constante hasta el final del ensayo (Figura 29). Si bien se registraron medias mayores para P+E y P en las últimas tres fechas de observación, y en general el tratamiento sP/sE tuvo las menores medias, la variabilidad entre réplicas no permitió concluir con confianza sobre los efectos principales de los tratamientos. Además, el resultado del ANOVA mostró interacción significativa ($p=0,02$) entre factores.

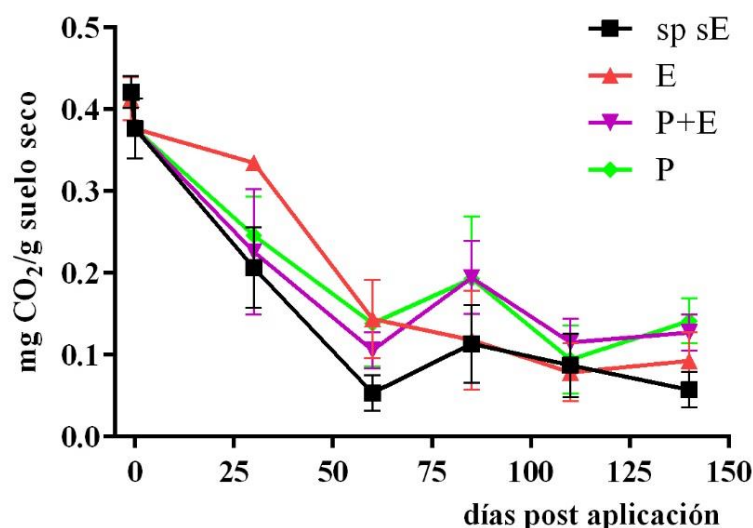


Fig. 5.6: Evolución de la respiración basal edáfica del ensayo de fitorremediación en el tiempo. Los tratamientos son sP sE: sin planta sin endosulfán; E: con endosulfán; P+E: planta y endosulfán; P: planta. Cada punto representa la media (n=4) y su desv. est.

5.3.3.2 Actividad deshidrogenasa (ADH)

Los datos de ADH se muestran en el cuadro 5.1 e indican que la actividad en suelo con endosulfán (E) no se distinguió estadísticamente del suelo sin endosulfán (sP/sE) y tampoco entre el momento previo a la aplicación y los 6 días posteriores. Es decir, no hubo efecto del endosulfán a esta dosis sobre la ADH. Por otro lado, en los tratamientos con planta (P y P+E) se observó un aumento significativo entre fechas de modo que al final del ensayo, se detectó mayor actividad.

Cuadro 5.1: Datos de actividad enzimática deshidrogenasa para tres tiempos del ensayo. Los valores representan medias ($n=4$) \pm desvío estándar. Dentro de cada columna, medias con una letra minúscula en común no son significativamente diferentes, y dentro de cada fila medias con letra mayúscula en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). nm: no medido

| Actividad enzimática deshidrogenasa ($\mu\text{g TPF/g h}$) | | | | | |
|---|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Tratamiento | Previo aplicación | Día 6 | Día 30 | Día 85 | Día 140 |
| sP sE | 1,41aA \pm 0,33 | nm | 2,37aB \pm 0,4 | 2,19aB \pm 0,45 | 2,45aB \pm 1,23 |
| E | 1,39aA \pm 0,11 | 1,32AB \pm 0,33 | 2,06abB \pm 0,56 | 2,52abB \pm 0,65 | 1,74aAB \pm 0,91 |
| P+E | nm | nm | 1,54bcA \pm 0,54 | 3,76bcB \pm 0,86 | 5,53bC \pm 1,25 |
| P | nm | nm | 0,89cA \pm 0,18 | 3,28cB \pm 1,21 | 6,7bC \pm 0,017 |

Se realizó un análisis de regresión tomando como variable dependiente la ADH y la biomasa radicular como regresora, y se concluyó que existe una relación lineal positiva ($p < 0,0001$). En la figura 5.7 se muestra gráficamente esta relación.

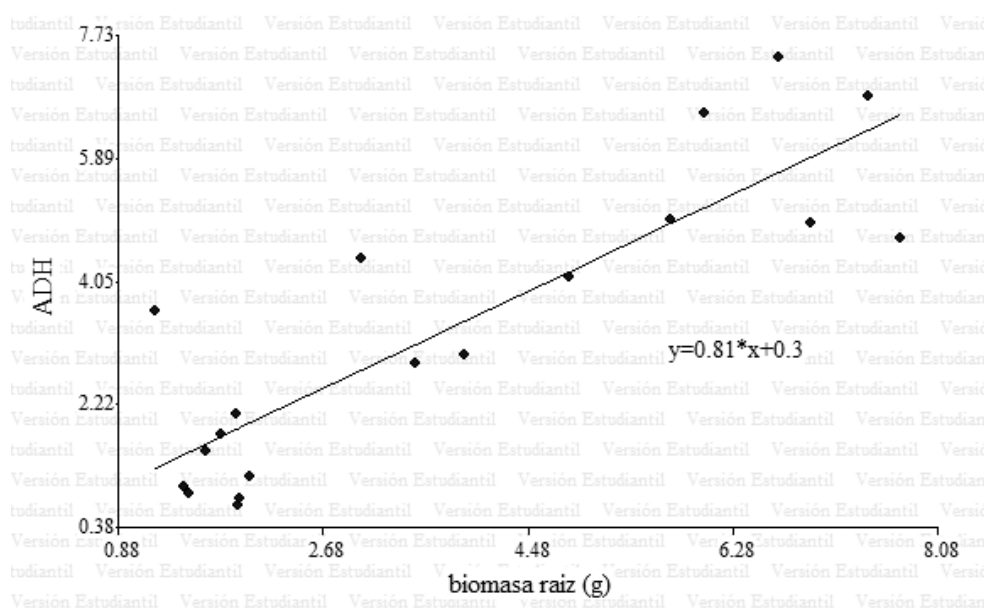


Fig. 5.7: Diagrama de dispersión de los datos de P y P+E. Los puntos son datos individuales y la línea sólida representa la función de ajuste. ADH: actividad deshidrogenasa, calculada como $\mu\text{g TPF/g h}$

5.3.4 Herbivoría

A pesar de que invernáculo tenía una malla protectora algunas de las plantas sufrieron herbivoría (y se descartaron del ensayo). Se encontraron larvas de lepidóptero

alimentándose de hojas y tallos de *M x g*, motivo por el cual algunas macetas fueron eliminadas del ensayo dado el nivel de daño provocado en las hojas. Las larvas se colectaron manualmente y se incubaron en cámara junto con hojas de *M. giganteus* hasta la emergencia de los adultos para su determinación:

Filum: Artrópoda

Clase: Insecta

Orden: Lepidoptera

Familia: HesperIIDae

Subfamilia: *disi*Género: *Lerodea*

Especie: eufala

Nombre binomial compuesto: *Lerodea eufala* (Edwards 1869)



Imagen 5.4: (izq.) Larvas de *L. eufala* recién colectadas. (der.) Adulto emergido post incubación.

5.4 Discusión

Se evaluó a una planta de interés energético como potencial fitorremediadora de endosulfán en suelo, para ello se eligió una dosis del insecticida que fuera ambientalmente relevante y se observó la interacción por 140 días. Muchas veces cuando se estudia fitorremediación el primer interrogante es acerca de la supervivencia y desarrollo de dicha planta. En este ensayo, con la dosis recomendada, fue concluyente que el endosulfán no tuvo efecto sobre el desarrollo de *Miscanthus x giganteus*. Respecto a otros estudios sobre el efecto del endosulfán sobre el desarrollo de plantas, Singh et al. (2019) ensayaron siete especies vegetales de interés ambiental y/o económico a tres dosis de endosulfán (500, 1000, 1500 mg/kg), observando que todas, excepto una, sufrieron un impacto negativo en el desarrollo con la menor dosis. Cabe destacar que esta menor dosis dista en tres órdenes de magnitud con la dosis empleada en este ensayo.

La segunda pregunta que se puede plantear es respecto al contaminante y su destino. Dado que las concentraciones de endosulfán residual en suelo fueron las mismas con o sin planta a lo largo del ensayo, se permitió descartar que hubieran ocurrido procesos de absorción y translocación. El insecticida aplicado en macetas bajo condiciones semi-controladas tuvo una degradación lenta ($t_{1/2}$ de 73 días) al compararla con resultados previos de esta tesis -en microcosmos bajo condiciones controladas- pero que se encuentra en el rango de lo encontrado por Weber et al. (2009). Esto pudo deberse a oscilaciones de temperatura día-noche (factor no controlado) y humedad (el agua se reponía a intervalos fijos de tiempo). Respecto a los isómeros, el cambio de relación entre ellos a lo largo del ensayo es acorde con otros resultados, según lo reportado el isómero α es el primero en descomponerse (Ghadiri y Rose 2001; Al-Hassan et al. 2009). Se observó un plateau

alrededor del 36% de recuperación, fracción que se mantuvo constante hasta los 140 días. Según la literatura, debe existir una mínima concentración del compuesto, de modo de cubrir ciertos requerimientos energéticos celulares de los microorganismos que lo degradan, y para asegurar la motilidad de los mismos hacia el compuesto (Adam et al. 2014; Rein et al. 2015), de lo contrario permanecerán concentraciones residuales del mismo. No se encontró en la literatura otro trabajo de fitorremediación que relacione a *M x g* y a endosulfán, u otro compuesto orgánico persistente, en bajas concentraciones. En este aspecto cabe discutir la elección de la dosis inicial; cuando se habla de remediación y fitorremediación son tecnologías que aplican a sitios contaminados mayormente por industrias, por derrames, es decir fuentes puntuales y muchos de los trabajos científicos utilizan concentraciones entre dos y cinco órdenes de magnitud mayores que los utilizados en esta tesis (Kästner y Miltner 2016; Brutti et al. 2018; Singh et al. 2019). El presente trabajo apuntó a la contaminación presuntamente originada por la actividad agrícola, una fuente difusa, y a la remediación de estos compuestos en concentraciones residuales, que son las que persisten en suelo y sedimentos, por lo que se trabajó con una dosis baja y ambientalmente relevante. Por tratarse de un ensayo en macetas, otro aspecto a tener en cuenta para no ensayar altas dosis (como las mencionadas en otros trabajos), es la generación de grandes volúmenes suelo contaminado que debe disponerse como un residuo peligroso, así como también el riesgo por exposición laboral a dichas dosis.

Respecto a las variables bioquímicas, la determinación de la ADH del suelo es uno de los criterios generalmente utilizados para determinar la actividad microbiana del mismo. La actividad deshidrogenasa elevada en suelos con mayor biomasa radicular sugiere que algunas poblaciones de microorganismos fueron efectivamente bioestimuladas pero no eran las

responsables de la degradación de endosulfán, de lo contrario se hubiera visto menor porcentaje recuperación de endosulfán en P+E. Se presume que la respuesta de la ADH estuvo asociada a la producción de exudados radiculares que actúan como sustratos carbonados para la microbiota, según los argumentos de Chaudhry et al. (2005) y Álvarez et al. (2012). En un trabajo citado anteriormente (Singh et al. 2019), se emplearon dosis de 500, 1000 y 1500 mg/kg y resultó que en varios casos la ADH se mantuvo igual con endosulfán en su dosis más baja y en el control; recién a partir de los 1000 mg/kg se observó incremento de la actividad microbiana. La dosis del mencionado trabajo fue tres órdenes de magnitud mayor que la empleada en este trabajo (0,315 mg/kg) y aun así la ADH no sufrió alteración. Una vez más una gran dosis provoca efectos más notables.

Por último, respecto al registro de *Lerodea eufala*, es relevante puesto que según el trabajo de revisión de Nsanganwimana et al. (2014) se le conocen muy pocas plagas a este cultivo, los pocos registros que hay engloban insectos, nematodos y hongos (Anderson et al. 2011), otro motivo por el que es un buen candidato para estrategias de biorremediación. No se halló ningún reporte en la literatura sobre *L. eufala* alimentándose de *M x g*.

5.5 Conclusiones

El endosulfán se degradó lentamente respecto a otros ensayos de incubación de esta tesis y la presencia de *Miscanthus x giganteus* no impactó en la velocidad de degradación. El aporte del capítulo es relevante a los fines de generar información del insecticida en suelos locales y condiciones de invernáculo (más parecidas a lo que sucede ambientalmente que en incubadora). Se conoció su vida media y su persistencia fue mayor que en condiciones de laboratorio, detectándose en bajas concentraciones incluso hasta 140 días luego de su aplicación.

Se concluye, además, que la fitorremediación con *M x g* no fue efectiva a estas concentraciones pero no se puede asegurar que no sea efectiva frente a mayores concentraciones del plaguicida. En rizósfera se comprobó mayor actividad microbiana que en suelo solo, pero no se vio reflejado en la degradación del endosulfán motivo por el cual se postulan dos hipótesis, una la falta de biodisponibilidad del mismo para los microorganismos con capacidad degradativa y/o dos, ausencia de estas poblaciones. En un diseño similar a futuro se podría ensayar la combinación de esta planta con inóculos bacterianos con conocida capacidad degradativa.

Capítulo 6. Discusión general y Conclusiones

6.1 Síntesis y discusión de los principales resultados de la tesis.

Esta tesis se propuso como objetivo general evaluar estrategias de remediación de suelos potencialmente contaminados con endosulfán y clorpirifos, en particular en suelos provenientes de la zona hortícola platense. En términos generales puede concluirse que se lograron desarrollar tanto el objetivo general como los objetivos específicos.

En el capítulo 3, el primer objetivo fue evaluar en qué proporción la degradación microbiana participa de la atenuación natural mediante un ensayo de microcosmos. La ausencia de descomposición de los plaguicidas en suelo estéril y la degradación total de clorpirifos y parcial de endosulfán en suelo no estéril sumado a la detección del metabolito endosulfán sulfato, nos permitió concluir que la acción microbiana del suelo juega un rol fundamental en la degradación de estos compuestos y en consecuencia, que la intensificación de la misma sería una estrategia promisorio hacia donde dirigir el esfuerzo. Otros procesos de transformación no resultaron ser relevantes (hidrólisis química) o no se estudiaron (como el caso de la fotólisis). En el caso de procesos de retención, se asumió que la técnica de extracción fue exhaustiva -como indican los porcentajes de recuperación cercanos a 100%- por lo cual si intervinieron fenómenos de adsorción/desorción con este enfoque metodológico no fue posible estudiarlos.

En ese mismo capítulo, el segundo objetivo fue conocer y comparar tasas de degradación de clorpirifos y endosulfán en suelos de la zona de estudio con diferente historia de uso. La hipótesis planteada, basada en el concepto de mineralización acelerada, fue que un suelo hortícola convencional (SH) tiene mayor capacidad degradativa de los plaguicidas antes mencionados, respecto a otro de producción orgánica (SA) y que a un suelo no productivo (SR). Esta hipótesis no se verificó sino que se observó que para esta concentración inicial, los plaguicidas tienen vida medias iguales. Al observar cualitativamente las curvas

SA y SR son similares entre si. Se halló una diferencia al discriminar por isómero, puesto que en SH el β -endosulfán fue más persistente que en los otros suelos, y en el caso del clorpirifos, la degradación tuvo un comportamiento descrito por un modelo bi-exponencial, es decir tuvo una fase inicial rápida seguida de una lenta. Se plantea como posible mejora del ensayo aumentar el número de repeticiones por tratamiento para reducir la incertidumbre de la medición, originada en la heterogeneidad entre muestras, aspecto natural en una matriz compleja como el suelo.

Cabe señalar que con los ensayos descritos no se apuntó a profundizar en los mecanismos degradativos (rutas metabólicas, presencia de co-factores, etc), sino que el objetivo fue estudiar la velocidad de degradación de estos compuestos basado en el análisis de residuos, datos que eran inexistentes para la zona (e inexistentes para la vasta mayoría del territorio nacional). La hipótesis acerca de las poblaciones microbianas presentes en los diferentes suelos y sus capacidades relativas de degradar podría ponerse a prueba estudiando la composición de la comunidad microbiana a través de un análisis funcional de microorganismos que puede ser basado en la caracterización del perfil metabólico de la comunidad microbiana o bien, un análisis completo de la estructura microbiana mediante análisis del ARNr 16S con el objetivo de comparar dichos suelos. También sería interesante correlacionar estructura con intensidad de uso del suelo.

En el capítulo 4, el objetivo fue evaluar las distintas fuentes de materia orgánica como potenciales bioestimulantes de la degradación de endosulfán y/o clorpirifos en suelo. Las enmiendas propuestas funcionaron acorde a la hipótesis inicial, como bioestimulantes (BS) de la comunidad microbiana y el efecto de esta estimulación sobre la degradación fue diferente para cada uno de los plaguicidas: en la parte A, en donde se ensayó cama de pollo

(CP), bokashi (BKS) y madera rameal fragmentada (BRF), hubo una disminución en la vida media del endosulfán cuando se aplicó BS y por otro, el clorpirifos tuvo mayor vida media con BS respecto al control. Según algunos autores la aplicación conjunta de plaguicidas puede modificar la biodegradabilidad de uno o ambos plaguicidas en la mezcla. Para evaluar esta posibilidad sería interesante desarrollar a futuro un ensayo donde además de aplicar los plaguicidas simultáneamente, se los aplique por separado, lo cual permitirá evaluar el efecto que la degradación de un plaguicida tiene sobre el otro. En el ensayo con okara (parte B) sí se redujo la vida media del clorpirifos con esta estrategia, llevándola de 14 días en el control a 5 días con el okara hidrolizado. Ese es otro hallazgo original de la tesis: la reducción de los pesos moleculares proteicos por hidrólisis resultó en una mejor fuente de consumo para los microorganismos impactando sobre la degradación del plaguicida. En la parte A, el clorpirifos tuvo menor degradación en presencia de enmiendas y se hipotetizó, basado en la literatura que su alta afinidad por la materia orgánica pudo disminuir su biodisponibilidad. Si bien es cierto que el clorpirifos tiene un alto K_{oc} y K_{ow} que justifique este razonamiento, también lo tiene el endosulfán y su degradación no se vio disminuida. Un estudio que esclarezca -al menos parcialmente- este mecanismo, podría basarse en la cinética de adsorción de ambos plaguicidas en suelo y en suelo+BS, para lo cual sería necesario ensayar condiciones estériles. A partir de las isothermas de adsorción se podrían calcular y comparar sus coeficientes de adsorción (K_f). Aun así, faltaría determinar si las poblaciones microbianas con capacidad de degradar específicamente uno y otro plaguicida tuvieron limitada su acción por la adsorción sobre el bioestimulante. Una limitación que tuvo este diseño, es que si bien se conoció el % de recuperación de la técnica de extracción en BS respecto al suelo a pocas horas de aplicado (no hubo diferencias), no se evaluó el % de recuperación de los compuestos en el tiempo. De modo que si hubo adsorción irreversible no extraíble por la técnica, esta fue

subestimada y catalogada como degradación. Respecto a las enmiendas utilizadas, la cama de pollo brindó buenos resultados como bioestimulante en la degradación de endosulfán, pero presentó toxicidad aguda en el ensayo de fitotoxicidad en semillas de lechuga. Vale aclarar que esta enmienda es empleada por los productores y además le da un destino a este residuo de la producción avícola enmarcándolo dentro de la economía circular. Debido a esto, sería mejor volver a evaluar eco-toxicológicamente este residuo en distintas proporciones con suelo y tiempos de estabilización, y re-evaluar su capacidad como bioestimulante para poder hacer recomendaciones en zonas en donde este residuo es abundante. Sería conveniente también encontrar la dosis óptima de los otros dos bioestimulantes (BKS y BRF) dado que, con vistas a una aplicación a campo, sería necesario hallar la mínima dosis con el mayor efecto biorremediador.

Para responder las diferentes preguntas de esta tesis se utilizó un suelo no productivo y prístino para excluir posibles interferencias asociadas a una historia particular de exposición a plaguicidas, y también contribuir a la reproducibilidad de los ensayos. Todos los ensayos se diseñaron de modo de tener un tratamiento que consistiera en suelo con insecticida únicamente (a veces llamado SR o C). En ese suelo de referencia (proveniente del Parque Pereyra Iraola) se observó que la persistencia de los plaguicidas no fue la misma si se realiza una comparación entre ensayos. Es claro que hubo variables que se modificaron como la concentración inicial y las condiciones de incubación, que podrían explicar por qué en el ensayo de atenuación natural la vida media del endosulfán (9,7 días) es menor que en el de bioestimulación (62 días), y ésta a su vez menor que en el de fitorremediación (76 días). Para el clorpirifos también hubo diferencias si se compara entre ensayos: atenuación natural (7,2 días), bioestimulación Parte B (14 días) y bioestimulación Parte A (22 días). La

influencia de las condiciones experimentales fue discutida en cada capítulo, pero el objetivo de mencionarlo aquí es para resaltar el carácter variable de la persistencia de estos insecticidas aun en condiciones experimentales controladas.

En cuanto a la detección de plaguicidas en huertas del cinturón hortícola platense (capítulo 2), la hipótesis se corroboró parcialmente. Los resultados arrojaron ausencia de clorpirifos, y de α - y β -endosulfán en las huertas relevadas, pero sí se observó la presencia de endosulfán sulfato (ES) en una de las huertas. El ES producto de la oxidación por parte de los microorganismos y esta ruta metabólica es muy frecuente. Por lo anterior, y porque tiene un comportamiento similar al compuesto parental (tóxico y persistente) es que también forma parte de la lista COPs del Convenio de Estocolmo. Si bien la comunidad científica local está realizando cada vez más esfuerzos en detectar plaguicidas en el ambiente, no se han encontrado estudios que reportaran la persistencia de ES en suelo productivo luego de la prohibición del 2013. Este hallazgo advierte sobre el carácter recalcitrante del compuesto y señala un problema a considerar en lo inmediato dada su capacidad de ser absorbido por algunas especies vegetales. La información generada en este capítulo es acorde a los resultados de los ensayos de laboratorio e invernáculo, puesto que en todos los casos se formó y acumuló endosulfán sulfato, y al finalizar los ensayos éste aun persistía. Con el objetivo de biorremediar suelos, sería necesario dirigir la atención a estrategias especialmente diseñadas para acelerar la degradación de ES, tema sobre el cual existen escasos antecedentes.

Respecto al clorpirifos, la bibliografía ha demostrado que su presencia en suelo es tóxica para los microorganismos e invertebrados del suelo por lo que es deseable su rápida degradación; basado en los resultados del relevamiento de huertas, la no detección sugiere que logra disiparse entre aplicaciones en suelo de huerta y bajo condiciones naturales. Se

concluye de los ensayos de incubación que no parece ser un compuesto recalcitrante en estos suelos.

La mejor estrategia fue la bioestimulación con okara hidrolizado (5 días) y le siguió con muy poca diferencia la atenuación natural (7,2 días) por lo que, al momento de analizar y comparar costos, tiempo y mano de obra, es posible que la atenuación natural sea preferible. Aun así, es valiosa la información del okara hidrolizado ya que estos resultados están sujetos a la concentración inicial y otras condiciones.

6.2 Conclusiones principales

- El clorpirifos no se encontró en suelos de huertas a pesar de ser un producto ampliamente utilizado. Su vida media en ensayos de incubación fue bajo para ser considerado persistente. Al comparar vidas medias entre el ensayo de atenuación y los de bioestimulación, se concluye que la primera es lo que mejor resultó para su disipación.
- El endosulfán sulfato, principal metabolito del endosulfán persiste en suelos hortícolas tres años después de su última aplicación. Al integrar todos los capítulos de esta tesis resulta que los hallazgos sobre endosulfán sulfato son preocupantes y se recomienda dirigir mayores esfuerzos hacia la detección y el diseño de estrategias de remediación de endosulfán sulfato en suelos con historia de uso.
- La acción de la microbiota edáfica cumple un rol fundamental en la degradación de estos insecticidas como lo demostró la persistencia de estos compuestos en suelo estéril durante 120 días.
- Las vidas medias en el experimento de atenuación natural fueron bajas y similares entre los suelos con diferente historia de uso. El clorpirifos en suelo hortícola convencional tuvo una cinética de degradación distinta a la del suelo hortícola orgánico y el de referencia,

presentando una rápida degradación inicial seguida de una fase lenta cuya vida media fue de 33 días; también se observó una degradación menor del isómero β -endosulfán en este suelo. Esto se atribuyó a diferencias en la estructura de la comunidad microbiana de cada suelo, pero queda para futuros estudios profundizar en dichos mecanismos.

- Se puede acelerar la biodegradación de endosulfán en suelo de la zona mediante la adición de enmiendas que actúen como bioestimulantes. El mejor resultado lo dio el bokashi (BKS) con bajo riesgo de toxicidad hacia los cultivos, y luego la cama de pollo (CP) con alto riesgo de toxicidad. Por último, la vida media del BRF no se distinguió de la del control, pero bioestimuló la microbiota edáfica a partir de los 30 día. Se concluyó que el BRF no está disponible como fuente de energía rápida para los microorganismos pero que podría ser efectivo a tiempos más largos.

- Se puede acelerar la degradación de clorpirifos, a través de la bioestimulación de los microorganismos del suelo con el hidrolizado de okara. Su alto contenido en proteínas de bajo peso molecular (<300 daltons) sirvió como fuente de consumo rápida para los microorganismos con mejor resultado que el okara en estado puro.

- Respecto al alcance sobre el cual se pueden extender conclusiones, el estudio se desarrolló principalmente en ensayos de laboratorio utilizando una unidad experimental denominada microcosmos. Se debe tener presente que el éxito de estas estrategias bajo condiciones controladas (o semi-controladas en el caso del ensayo en invernáculo), no asegura el éxito en condiciones naturales. Para el endosulfán evaluar técnicas a campo implicaría trabajar sobre un campo ya impactado. Sobre esto, se sabe que existen pasivos ambientales asociados a depósitos, pero de difícil acceso y aun haría falta su relevamiento previo y análisis detallado de los xenobióticos presentes. Luego de la extensa revisión

bibliográfica realizada para esta tesis, se concluye que apenas existe información sobre biodegradación de plaguicidas *in situ* en suelos agrícolas a nivel mundial. Continuar con la biorremediación de suelos impactados con plaguicidas persistentes en el territorio no debería ser responsabilidad de un/a investigador/a o de la comunidad científica individualmente, sino parte de una acción conjunta entre gobiernos locales y nacionales, productores, empresas, etc.

6.3 Contribuciones originales de la tesis.

- El endosulfán sulfato persiste en suelo hortícola después de 3 años de la última aplicación, y se acumula como se observó en todos los ensayos de degradación de endosulfán en suelo.

- Se obtuvieron tasas de degradación de dos de los insecticidas más utilizados en la Argentina durante una década, uno de ellos (clorpirifos) aun ampliamente utilizado. En nuestro conocimiento, a nivel nacional se están realizando esfuerzos en la detección de plaguicidas en distintas matrices y en estudios toxicológicos, pero este tipo de estudio de degradación de endosulfán en suelo agrícola con determinación de vidas medias no se había realizado.

- La caracterización y evaluación de las enmiendas orgánicas okara, BKS y BRF como bioestimulantes, es decir con fines de biorremediación es un aporte original de esta tesis, de lo cual no se han encontrado antecedentes.

- Del mismo modo, tampoco había antecedentes sobre la utilización de *Miscanthus x giganteus* como fitorremediadora de plaguicidas, y si bien no dio el resultado deseado desde el punto de vista la de biorremediación, gracias a este trabajo se determinó que su rizosfera

estimula la actividad microbiana, por lo que no se descarta su potencial como fitorremediadora a concentraciones más elevadas.

6.4 Futuras líneas de trabajo

- Se aislaron de un suelo hortícola 6 cepas bacterianas con capacidad de crecer en endosulfán, y una de ellas con capacidad de degradarlo. Aún quedaron por realizarse los ensayos de degradación con las cuatro cepas restantes y su identificación. Además, dado que estas cepas se aislaron del mismo establecimiento en el cual se detectó endosulfán sulfato sería interesante aislar del mismo, cepas capaces de degradar este compuesto en un experimento similar al realizado en el Capítulo 3 parte B pero utilizando endosulfán sulfato como fuente de carbono.

- Se propone estudiar la composición de la comunidad microbiana de SH, SA y SR un a través de una caracterización del perfil metabólico de la comunidad microbiana o un análisis completo de la estructura microbiana con el objetivo de comparar dichos suelos y poder explicar sus diferencias en cuanto a su capacidad degradativa.

- Se propone realizar experimentos de bioaumentación con las cepas aisladas en el capítulo 3, en ensayos combinados con bioestimulación y/o fitorremediación, tanto para endosulfán como para endosulfán sulfato.

- Basado en los resultados del Cap. 4, se propone evaluar a BRF a mayores tiempos experimentales y observar su efecto sobre concentraciones residuales. También estudiar el potencial degradador de los hongos de la pudrición blanca asociados a la madera rameal fragmentada (BRF).

- Evaluar a BKS, BRF y CP como bioestimulantes en un lote bajo condiciones naturales -productivo o no- impactado con endosulfán/endosulfán sulfato.

6.5 Apreciaciones finales

Los resultados obtenidos durante este trabajo reflejan la gran cantidad de respuestas que puede tener un plaguicida en suelo (y en condiciones controladas), y sobre el hecho de que su destino en el ambiente puede ser muy complejo. Este hecho nos hace reflexionar como profesionales, como científicos y como seres humanos, sobre las consecuencias de liberar sustancias sintéticas, de forma masiva como lo ha hecho la Argentina sin un análisis profundo de su impacto en el ambiente, los ecosistemas y en la salud humana. El endosulfán fue en su momento un reemplazo del DDT, lo que inmediatamente lleva a preguntar ¿Con qué nueva sustancia estaremos reemplazando al hoy prohibido endosulfán? ¿Existe suficiente información sobre ella? ¿Quién genera esa información?

Los hallazgos de esta tesis son totalmente acordes a lo que plantea la comunidad científica y esto es, en pocas palabras, que el comportamiento de un plaguicida en suelo es multidimensional, por la complejidad misma del suelo, de la comunidad microbiana y sus interacciones bioquímicas. Los factores que los afectan son entre ellos, las propiedades químicas del plaguicida, la concentración utilizada, la estructura de la comunidad microbiana, el tipo de suelo y las condiciones en que está ese suelo, pero debe tenerse en cuenta que estos factores no afectan siempre del mismo modo y es frecuente encontrar resultados divergentes en la literatura. Lo anterior puede parecer desmoralizante, pero es aún mejor motivo para generar más información sitio-específica y estudiar el comportamiento de estos plaguicidas y su respuesta frente a las distintas estrategias. La biorremediación de plaguicidas recalcitrantes, entre ellos el endosulfán sulfato es una tarea desafiante que aún necesita investigación profunda en nuestro país.

Bibliografía

Abraham W. R., Nogales B., Golyshin P. N., Pieper D. H. y K. N Timmis. 2002. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities and sediments. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 246–253

ACUMAR. 2009. Autoridad Cuenca Matanza-Riachuelo. Resultados analíticos de calidad de los acuíferos pampeano y puelche Mayo 2008 – Junio 2009.

Adam I., Miltner A. y M. Kästner. 2015. Degradation of ^{13}C -labelled pyrene degradation in soil-compost mixtures and fertilized soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:9813–9824

Adler-Nissen J. 1977. Enzymatic hydrolysis of food protein. *Proc Biochem*. 12, 15-32.

Alef K. 1995. Dehydrogenase activity en *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Alef K. y P.Nannipieri. (eds.) pp. 228–231. Academic Press

Alexandratos N. y J. Bruinsma. 2012. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. ESA Working paper No. 12-03. FAO, Rome.

Al-Hassan R. M., Bashour I. I., y Kawar N. S. 2004. Biodegradation of α and β Endosulfan in Soil as Influenced by Application of Different Organic Materials. *Journal of Environmental Science and Health, Part B- Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 39(5-6), 757–764.

Álvarez A., Yañez M.L., Benimeli C.S., Amoroso M.J. 2012. Maize plants (*Zea mays*) root exudates enhance lindane removal by native *Streptomyces* strains. *International Biodeterioration & Biodegradation* 66 (1): 14-18

Álvarez M., Du Mortier C., Jaureguiberry S. y A. Venturino. 2019. Joint Probabilistic Analysis of Risk for Aquatic Species and Exceedence Frequency for the Agricultural Use of Chlorpyrifos in the Pampean Region, Argentina. *Environmental Toxicology and Chemistry* Volume 38 (8): 1748–1755

Álvarez M., du Montier C., Sokolic T. y A.F. Cirelli. 2013. Studies on the Persistence of a Commercial Formulation of Chlorpyrifos on an Agricultural Soil from Provincia de Buenos Aires, República Argentina. *Water Air Soil Pollut* 224:1571

Anderson J.P.E. 1982. Soil Respiration. En: Page, A.L., Miller, R.H. y D.R.Keeney (eds.) *Methods of soil analysis. Part 2*. American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, EEUU, pp 831-866

Anderson E., Arundale R., Maughan M., Oladeinde A., Wycislo A. y T. Voigt. 2011. Growth and agronomy of *Miscanthus giganteus* for biomass production. *Biofuels* 2, 167-183.

Anwar S., Liaquat F., Khan Q.M., Khalid Z.M. y S. Iqbal. 2009. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. *J Hazard Mater*. 168(1):400-405.

Aparicio V., De Gerónimo E., Hernández Guijarro K., Pérez D., Portocarrero R. y C. Vidal. 2015. Los plaguicidas pgregados al suelo y su destino en el ambiente. INTA Ediciones (1a Edición).

Arbeli Z. y C. Fuentes. 2007. Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension. *Crop Protection* 26: 1733–1746

Arinaitwe K., Rose N., Muir D.C.G., Kiremire B.T., Balirwa J.S. y C. Teixeira. 2016. Historical deposition of persistent organic pollutants in Lake Victoria and two alpine equatorial lakes from East Africa: Insights into atmospheric deposition from sedimentation profiles. *Chemosphere* 144: 1815-1822

Astoviza M.J., Cappelletti N., Bilos C., Migoya M.C. y J.C. Colombo. 2016. Massive airborne Endosulfan inputs related to intensive agriculture in Argentina's Pampa. *Chemosphere* 144:1459-1466

ATSDR. 2010. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades División de Toxicología y Medicina Ambiental. <http://www.atsdr.cdc.gov/es>

Awasthi N., Ahuja R. y A. Kumar. 2000. Factors influencing the degradation of soil applied endosulfan isomers. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 1697–1705.

Awasthi, N., Manickam, N. y A. Kumar. 1997. Biodegradation of endosulfan by a bacterial coculture. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*. 59: 928–934.

Awasthi N., Singh A.K., Jain R.K., Khangarot B.S. y A. Kumar. 2003. Degradation and detoxification of endosulfan isomers by a defined co-culture of two *Bacillus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:279–283

Babic S., Petrovi M. y M. Kaštelan-Macan. 1998. Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil. *J. Chromatogr. A*. 823: 3-9

Barriuso E., Houot S. y C. Serra-Wittling. 1997. Influence of Compost Addition to Soil on the Behaviour of Herbicides. *Pestic. Sci.*, 49: 65-75.

Baccaro K., Degorgue M., Lucca M., Picone L., Zamuner E. y Y. Andreoli. 2006. Calidad del agua para consumo humano y riego en muestras del cinturón hortícola de Mar del Plata. *RIA Revista de Investigaciones Agropecuarias* 35 (3): 95-110 Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Buenos Aires, Argentina

Baskaran S., Kookana R. S. y R. Naidu. 1999. Degradation of bifenthrin, chlorpyrifos and imidacloprid and bedding materials at termiticidal application rates. *Pest. Sci.* 55, 1222–1228

Ben Salem A., Chaabane H., Caboni P., Angioni A., Salghi R. y S. Fattouch. 2019. Environmental fate of two organophosphorus insecticides in soil microcosms under Mediterranean conditions and their effect on soil microbial communities, *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, DOI:10.1080/15320383.2018.1564733

Benecia R., Quaranta G. y J. Souza Casadinho (comps.). 2009. Cinturón Hortícola de la ciudad de Buenos Aires. Cambios sociales y productivos. Ed Ciccus. Buenos Aires.

Bera T., Collins H.P., Alva A.K., Purakayastha T.J. y A.K. Patra. 2016. Biochar and manure effluent on soil biochemical properties under corn production. *Appl. Soil Ecol.* 107: 360-367.

Bertolí Herrera M.P., Alfonso E.T. y D. Agüero. 2015. Producción y uso del abono orgánico tipo bocashi. Una alternativa para la nutrición de los cultivos y la calidad de los

suelos. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Ediciones INCAISBN: 978-959-7023-78-4

Bisht J., Palni L. M. S. y N. S. K. Harsh. 2018. Pesticide contamination and human health. In K. A. Wani, y Mamta (Eds.), Handbook of research on the adverse effects of pesticide pollution in aquatic ecosystems (pp. 137–150). Hershey, PA: IGI Global.

Bisht J., N. S. K. Harsh, L. M. S. Palni, V. Agnihotri y A. Kumar. 2019. Biodegradation of chlorinated organic pesticides endosulfan and chlorpyrifos in soil extract broth using fungi. Remediation Journal 29:63–77.

Blaylock M.J. Field demonstrations of phytoremediation of lead-contaminated soils. In: TERRY, N.; BAÑUELOS, G. (Ed.). Phytoremediation of contaminated soil and water. Boca Raton: Lewis Publishers, 2000, P.1-12.

Botello A.V., J. Rendon Von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández. 2005. Golfo de México: Contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias. 2da edición. Universidad Nacional Autónoma de México.

Branzini A. 2014. Remediación biótica y abiótica de un suelo contaminado con cobre, cinc y cromo. Monitoreo biológico. Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires. Área Ciencias Agropecuarias.

Brosse N., Dufour A., Meng X.Z., Sun Q.N. y A. Ragauskas. 2012. *Miscanthus*: a fastgrowing crop for biofuels and chemicals production. Biofuels Bioprod. Biorefin. 6: 580-598

Brookes P.C. 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. Biol. Fert. Soils 19: 269–279

Brutti L., Beltrán M. y García Salamone I. (eds). 2018. Biorremediación de los recursos naturales 1a ed. - Buenos Aires: Ediciones INTA.

Bulut S., Akkaya L., Gok V. y M. Konuk. 2010 Organochlorine Pesticide Residues in Butter and Kaymak in Afyonkarahisar, Turkey. Journal of Animal and Veterinary Advances 9 (22): 2797-2801

Burrows L. A. y C. A. Edwards. 2002. The use of integrated soil microcosms to predict effects of pesticides on soil ecosystems. European Journal of Soil Biology 38: 245–249

Bussian B.M., Pandelova M., Lehnik-Habrink P., Aichner B., Henkelmann B. y K.W. Schramm. 2015. Persistent endosulfan sulfate is found with highest abundance among endosulfan I, II, and sulfate in German forest soils. Environmental Pollution 206: 661-666

Calandrelli L. y M.L. Falcón. 2018. Efecto de enmiendas orgánicas sobre el suelo y cultivo de lechuga protegido. Tesis de grado. Facultad Ciencias Agrarias, UNLP. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/69820>

Caron C. 1994. Ramial chipped wood: a basic tool for regenerating soils. Dixième conférence internationale de l'international federation of organic agriculture movements (IFOAM).

Carvalho F.P. 2017. Review: Pesticides, environment, and food safety. Food and Energy Security 6(2): 48–60

- CASAFE. 2012. Mercado Argentino 2012 de Productos Fitosanitarios.
- Castro J., Sánchez-Brunete C., Rodríguez J.A. y J.L. Tadeo. 2002. Persistence of chlorpyrifos and endosulfán in soil. *Fresenius Environ. Bulletin* 11 (9): 578 - 582
- CELS. ACIJ, COHRE. 2009. El acceso a agua segura en el Área Metropolitana de Buenos Aires. Una deuda impostergable.
- Cerrillo I., Granada A., López-Espinosa M.J., Olmos B., Jiménez M., Caño A., Olea N. y M. Fátima Olea-Serrano. 2005. Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. *Environ Res.* 98(2): 233-9.
- Chai L.K., Wong M.H. y H.C. Brunn Hansen. 2013. Degradation of chlorpyrifos in humid tropical soils. *J. Env. Manag.* 125, 28-32.
- Chaudhry Q., Blom-Zandstra M., Gupta S. y E.J. Joner. 2005. Utilizing the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 12: 34-48
- Chauduri K., Selvaraj S. y A. Pal. 1999, Studies on the genotoxicity of endosulfán in bacterial systems. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 439(1):63-7.
- Cheung Y.H. y M.H. Wong. 1983. Utilization of animal manure and sewage sludge for growing vegetables. *Agric. Wastes* 5: 63-81.
- Choi I.S., Kim Y.G., Jung J.K. H.J. Bae. 2015. Soybean waste (okara) as a valorization biomass for the bioethanol production. *Energy* 93, 1742-1747.
- Chouychai W. 2012. Effect of some plant growth regulators on lindane and alpha-endosulfan toxicity to *Brassica chinensis*. *J. Environ. Biol.* 33, 811-816. ISSN: 0254-8704
- Chu X., Fang H., Pan X. Wang X., Shan M., Feng B. y Y. Yu. 2008. Degradation of chlorpyrifos alone and in combination with chlorothalonil and their effects on soil microbial population. *J. Environ. Sci.* 20, 464-469
- Coats J. R. 1991. Pesticide degradation mechanisms and environmental activation. In *ACS Symposium Series-American Chemical Society (USA)*.
- Comisión Europea. 2006. Towards a Thematic Strategy on soil protection. SEC (2006) 620 y SEC (2006)1165. http://ec.europa.eu/environment/soil/pdf/sec_2006_620_en.pdf
- Comisión Europea. 2015. Circular Economy. Closing the loop: an ambitious EU circular economy package. https://ec.europa.eu/commission/publications/ambitious-eu-circular-economy-package_en
- Comisión Europea. 2016. Legislation on Maximum Residue Levels. MRLs for chlorpyrifos in or on certain products [EU 2016/60](#)
- Cole M.A., Zhang Liua y Xianzhong Liu. 1995. Remediation of Pesticide Contaminated Soil by Planting and Compost Addition. *Compost Science & Utilization*. Volume 3, Issue 4
- Cooperband L. y J.H. Middleton. 1996. Changes in chemical, physical and biological properties of passively-aerated cocomposted poultry litter and municipal solid waste compost. *Compost Sci Util* 4, 24-34

Cumming H. y C. Rücker. 2017. Octanol–Water Partition Coefficient Measurement by a Simple ¹H NMR Method. *ACS Omega* 2: 6244–6249

Damgaard I., Skakkebæk N., Toppari J., Virtanen H., Shen H., Schramm K., Petersen J. H., Jensen T. y Main K. 2006. Persistent Pesticides in Human Breast Milk and Cryptorchidism. *Environ Health Perspect.* 114(7): 1133–1138.

Darder M.L., Caprile A.C. y L.A. Milesi Delaye. 2016. Contaminación en agroecosistemas. Estudio de caso de la cuenca del arroyo Pergamino. Parte 2 “Escurrecimiento y Plaguicidas”. *RTA10* (30):57-61.

Davis R. y M. Frearson. 1987. *Mass Spectrometry: Analytical Chemistry by Open Learning*. John Wiley and Sons Inc.

Deuter M. 2000. Breeding Approaches to Improvement of Yield and Quality in *Miscanthus* Grown in Europe. European *Miscanthus* Improvement (EMI) Project, p. 25

Di Ciocco C.A., Sandler R.V., Falco L.B. y C.E. Coviella. 2014. Actividad microbiológica de un suelo sometido a distintos usos y su relación con variables físico- químicas. *Rev. FCA UNCUIYO* 46 (1): 73-85. ISSN impreso D370-466. ISSN (en línea) 1853-8665

Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada y C.W. Robledo. *InfoStat* versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

DP-UNLP. 2015. Defensor del Pueblo de la Provincia de Buenos Aires y Universidad Nacional de La Plata. Relevamiento de la utilización de agroquímicos en la provincia de Buenos Aires. Mapa de situación e incidencias sobre la salud. http://www.agro.unlp.edu.ar/sites/default/files/paginas/informe_agroquimicos_comprimido.pdf

Eivazi F. y M.A. Tabatai. 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 601-606

Emino, E. R. y P. R. Warman. 2004. Biological assay for compost quality. *Compost Sci. Util.* 12: 342-348

Erlich J.L. y C.L. Brierley. 1990. *Microbial mineral recovery*. McGraw-Hill, New York.

Etchejoyen M.A., Ronco A.E., Almada P., Abelando M. y D.J. Marino. 2017. Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. *Environ Monit Assess* 189: 63

Fan S., Li P., Gong Z., Ren W. y He N. 2008. Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Chemosphere*, 71: 1593-1598.

Fang H., Yu Y., Chu X., Wang X., Yang X. y Yu Y. 2009. Degradation of chlorpyrifos in laboratory soil and its impact on soil microbial functional diversity. *J. Environ. Sci.* 21, 380-386.

FAO. 2011. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Elaboración y Uso del Bocashi. Programa especial para la seguridad alimentaria en El Salvador – gcp/els/007/spa <http://www.fao.org/3/a-at788s.pdf>

Feito M.C. 2013. Agricultura familiar con enfoque agroecológico en zonas periurbanas. Análisis de una experiencia de intervención para el desarrollo rural en Lujan (Buenos Aires, Argentina); Universidad Autónoma de Chile. Facultad de Educación; Nadir; 5; 1; 1-2013; 1-19.

Fenik J., M. Tankiewicz y M. Biziuk. 2011. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trends in Analytical Chemistry* 30 (6): 814-826.

Fenoll J., Ruiz E., Flores P., Hellín P. y S. Navarro. 2011. Reduction of the movement and persistence of pesticides in soil through common agronomic practices. *Chemosphere* 85 (8)1375-1382.

Flores A.P. 2013. Determinación de la exposición a plaguicidas de los productores hortícolas y florícolas. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de General Sarmiento. Buenos Aires, Argentina.

Franco-Andreu L., Gómez I., Parrado J., García C., Hernández T. y M. Tejada. 2016. Behavior of two pesticides in a soil subjected to severe drought. Effects on soil biology. *Appl. Soil Ecol.* 105: 17-24.

Frediani J. C. 2009. Las nuevas periferias en el proceso de expansión urbana. El caso del partido de La Plata. *Geograficando: Revista de Estudios Geográficos*, 2009 5(5). ISSN E 2346-898X

Fuentes A., Lloréns, Sáez M., Aguilar J., Ortuño M.I., J.F. y V.F. Meseguer. 2004. Phytotoxicity and heavy metals speciation of stabilised sewage sludges. *J.Hazard. Mater.* 108, 161–169.

Fulekar M. H. 2014. Rhizosphere Bioremediation of Pesticides by microbial consortium and potential microorganism. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 3(7) 235-248

Gange J. 2014. Resultados analíticos de cama de pollo con diferentes condiciones y manejos del Departamento uruguay y Colón. 2014. Profam uruguay. INTA AER Uruguay.

García C., Hernández T., Costa F., Ceccanti B. y G. Masciandaro. 1993. The dehydrogenase activity of soil as an ecological marker in processes of perturbed system regeneration. *Proceeding of the XI International Symposium on Environmental Biogeochemistry*, pp. 99- 100, Salamanca, Spain

García, C., Costa, F. y Hernández, T. 1994. Microbial activity in soils under Mediterranean conditions. *Soil biology & biochemistry* 26, 1116-1122.

García C. y Hernández T. 2000. Investigación y perspectivas de la enzimología de suelos en España. CEBAS-CSIC, Murcia 352 pp

Gebremariam S.Y., Beutel M., Yonge D., Flury M., Harsh J.B. 2012. Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soils and sediments. *Rev Environ Contam Toxicol.* 215:123-75

Gentry T.J., Rensing C. y I.L. Pepper. 2004. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Crit Rev Environ Sci Technol* 34:447–494

Getzin L. W. 1981. Degradation of chlorpyrifos in soil: influence of autoclaving, soil moisture, and temperature. *Journal of Economic Entomology* 74, 158–162

- Ghadiri H. y C. W. Rose. 2001. Degradation of endosulfan in a clay soil from cotton farms of western Queensland. *Journal of Environmental Management* 62, 155–169
- Glick B.R. 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Adv.* 28: 367-374
- Goebel H., Gorbach S., Knauf R. H. y R. Huttenbach. 1982. Properties, effects, residues and analysis of the insecticide endosulfan. *Residue Rev.* 83:161–165
- Gómez I., Rodríguez-Morgado B., Parrado J., García C., Hernández T. y M. Tejada. 2014. Behavior of oxyfluorfen in soils amended with different sources of organic matter. Effects on soil biology. *J. Hazard. Mat.* 273, 207-214.
- González-López J., Martínez-Toledo M.V., Pozo C., Rodelas B., Gómez M.A. y E. Hontoria. 2004. Pesticides and denitrifying microbiota. *Trends in Soil Science* 3: 91-97
- Gouma S., Papadaki A. A., Markakis G., Magan N. y D. Goumas. 2019. Studies on pesticides mixture degradation by white rot fungi. *Journal of Ecological Engineering* 20:16–26.
- Grenni P., Caracciolo A. B., Rodríguez-Cruz M. S. y M. J. Sánchez-Martín. 2009. Changes in the microbial activity in a soil amended with oak and pine residues and treated with linuron herbicide. *Applied Soil Ecology* 41:2–7.
- Hageman K.J., Simonish S.L., Campbell D.H., Wilson G.R. y D.H. Landers. 2006. Atmospheric deposition of current-use and historic-use pesticides in snow in national parks in the western United States. *Environ Sci Technol* 40 (10):3174-3180
- Hang S. y M.E. Nassetta. 2003. Evolución de la degradación de atrazina en dos perfiles de suelo de la provincia de Córdoba. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 32 (1): 57-69
- Hattab N., Faure O., Bouchardon J.L. y M. Motelica-Heino. 2015. Effect of fresh and mature organic amendments on the phytoremediation of technosols contaminated with high concentrations of trace elements. *Journal of Environmental Management* 159: 37-47
- Heredia O.S. y Fernández Cirelli A. 2008. Importancia de las propiedades de los suelos en la determinación del riesgo de contaminación de acuíferos. 2008. *Cienc. suelo* vol.26 no.2
- Higson S.P.J. 2004. *Analytical Chemistry*. OXFORD University Press ISBN 978-0-19-850289-0
- Hunt L., C. Bonetto, V. H. Resh, D. F. Buss, S. Fanelli, N. Marrochi y M. J. Lydy. 2016. Insecticide concentrations in stream sediments of soy production regions of South America. *Science of the Total Environment* 547:114–124.
- INDEC. 2010. Instituto Nacional de Estadística y Censos. Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas.
- INTA. 2015. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente. 1ª ed. Balcarce, Buenos Aires; Famaillá, Tucumán; Reconquista, Santa Fe. Ediciones INTA, 2015. 73 p. ISBN 978-987-521-665-5

INTA. 2017. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Tecnología para producir alimentos frescos y de calidad. Artículo digital. <https://intainforma.inta.gob.ar/tecnologia-para-producir-alimentos-frescos-y-de-calidad/>

Ismail B.S., Enoma A.O.S., Cheah U.B, Lum K.Y. y Z. Malik. 2000. Microbial degradation of endosulfán in agricultural soils. *AJSTD*, 22 (2005), pp. 233–240

ISO 11261. 1995. Soil Quality - Determination of total nitrogen - Modified Kjeldahl method

Jaiswal D. K., Verma J.P. y J. Yadav. 2017. Microbe Induced Degradation of Pesticides in Agricultural Soils en S.N. Singh (ed.), *Microbe-Induced Degradation of Pesticides, Environmental Science and Engineering*. Springer International Publishing DOI 10.1007/978-3-319-45156-5_8

Jackson B.P., Bertsch P.M., Cabrera M.L., Camberato J.J., Seaman J.C. y C.W. Wood. 2003. Trace element speciation in poultry litter. *J. Environ. Qual.* 32: 535–540

Jergentz S., H. Mugni, C. Bonetto y R. Schulz. 2005. Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61: 817–826

Jimenez-Torres C., Ortiz I., San-Martin P. y R.I. Hernandez Herrera. 2016. Biodegradation of malathion, α and β -endosulfan by bacterial strains isolated from agricultural soil in Veracruz, Mexico. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, DOI: 10.1080/03601234.2016.1211906

Johnsen R.E. y R.I. Starr. 1972. Ultrarapid extraction of insecticides from soil using a new ultrasonic technique. *J. Agric. Food Chem.* 20, 48-51

Jones D. K., Hua J. y R. A. Relyea. 2016. Effects of endosulfan in freshwater pond communities. *Freshwater Science* 35:152–163.

Juvonen R., Martikainen E., Schultz E., Joutti A., Ahtiainen J. y M. Lehtokaria. 2000. A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste. *Ecotox. Environ. Safe.* 47: 156-166.

Kadian N., Malik A., Satya S. y P. Dureja. 2012. Effect of organic amendments on microbial activity in chlorpyrifos contaminated soil. *J. Environ. Manage.* 95, S199–S202.

Kaloyanova-Simeonova F., Bratanova Z., Bratinova S., Dura G., Simeonov J., Kambourova V. y Rizov T. 2001. Human Exposure and Risk Assessment of Soil Pollution with Persistent Organochlorine Compounds in Bulgari. *CEJOEM Vol.7 (3-4):263-275*

Kandeler E. y G. Gerber. 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* 6, 68-72.

Kästner M. y B. Mahro. 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. *Appl Microbiol Biotechnol* 44(5):668–675

Kästner M. y A. Miltner. 2016. Application of compost for effective bioremediation of organic contaminants and pollutants in soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:3433–3449

Kataoka R. y K. Takagi. 2013. Biodegradability and biodegradation pathways of endosulfán and endosulfan sulfate. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:3285–3292

Kazunga C. y M.D. Aitken. 2000. Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 66(5):1917-22.

Kim E.J., Park Y.M., Park J.E., Kim J.G. 2014. Distributions of new Stockholm Convention POPs in soils across South Korea. *Science of the Total Environment* 476–477: 327–335

Kocoń A. y Jurga B. 2016. The evaluation of growth and phytoextraction potential of *Miscanthus x giganteus* and *Sida hermaphrodita* on soil contaminated simultaneously with Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn. *Environmental Science and Pollution Research* 24 (5): 4990–5000

Kong L., Zhu S., Zhu L., Xie H., Su K., Yan T., Wang J., Wang F., Sun F. 2013. Biodegradation of organochlorine pesticide endosulfán by bacterial strain *Alcaligenes faecalis* JBW4. *Journal of Environmental Sciences* 25(11):2257-2264

Koskinen W.C. y S.S. Harper. 1990. The Retention Process: Mechanisms. *Soil Science Society of America*, 677 . USA. Pesticides in the Soil Environment-SSSA Book Series, no. 2. Chapter 3

Kumar A., Awasthi N., Ahuja R. 2000. Factors influencing the degradation of soil-applied endosulfán isomers. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 1697-1705

Kumar M. y L. Philip. 2006. Enrichment and isolation of a mixed bacterial culture for complete mineralization of endosulfan. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 41:81–96.

Kumar M., Lakshmi C. V. y S. Khanna. 2008. Biodegradation and bioremediation of endosulfan contaminated soil. *Bioresource Technology*, 99(8), 3116-3122. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.057>

Kumar S. 2011. Bioremediation of Endosulfán by bacteria isolated from the agricultural fields. *International Journal of Pharmaand Bio sciences*. 2(3): 367-374

Kwon G.S., Kim J.E., Kim T.K., Sohn H.Y., Koh S.C., Shin K.S., Kim D.G. 2002. *Klebsiella pneumoniae* KE-1 degrades endosulfan without formation of the toxic metabolite, endosulfan sulfate. *FEMS Microbiol Lett* 215:255–259

Lee J.B., Sohn H.Y., Shin K.S., Jo M.S., Kim J.E., Lee S.W., Shin J.W., Kum E.J., Kwon G.S. 2006. Isolation of a soil bacterium capable of biodegradation and detoxification of endosulfan and endosulfan sulfate. *J Agric Food Chem* 54: 8824–8828

Lemieux G. 1996. The hidden world that feeds us: the living soil. Editado por Department of Wood and Forestry Science Coordination Group on Ramial Wood. Laval University. N°59b

- Lesueur C., Gartner M., Mentler A. y M. Fuerhacker. 2008. Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–ion trap–mass spectrometry. *Talanta* 75: 284–293
- Lewandowski I. y U. Schmidt. 2006. Nitrogen, Energy and Land Use Efficiencies of Miscanthus, Reed Canary Grass and Triticale as Determined by the Boundary Line Approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 112 (4): 335–46.
- Li K., Xing B. y W. A. Torello. 2005. Effect of organic fertilizers derived dissolved organic matter on pesticide sorption and leaching. *Environmental Pollution* 134:187–194.
- Li W., Yun D., Beibei X., Li Y., Xiang P. y Z. Jingshun. 2008. Biodegradation and detoxification of endosulfan in aqueous medium and soil by *Achromobacter xylosoxidans* strain CS5. *Journal of Hazardous Materials*, 167: 209–216
- Littlewood A.B. 1970. *Gas Chromatography, Principles, Techniques and Applications*. Academic Press, New York 1970. 2. Aufl., 546 S., DM ca. 90.
- Lupi L., Bedmar F., Wunderlin D.A. y Miglioranza K.S.B. 2016. Organochlorine pesticides in agricultural soils and associated biota. *Environ Earth Sci*: 75:519
- Mac Loughlin T. M., L. Peluso y D. J. G. Marino. 2017. Pesticide impact study in the peri-urban horticultural area of Gran La Plata, Argentina. *Science of the Total Environment* 598:572–580.
- Mac Loughlin T. M., M. L. Peluso, M. A. Etchegoyen, L. L. Alonso, M. C. de Castro, M. C. Percudani y D. J. G. Marino. 2018. Pesticide residues in fruits and vegetables of the Argentine domestic market: Occurrence and quality. *Food Control* 93:129–138.
- McCool DK, Pannkuk CD, Kennedy AC, Fletcher PS. 2008. Effects of burn/low-till on erosion and soil quality. *Soil & Tillage Research* 101, 2–9.
- McCormick B., Rodríguez H., Sokolowski A., Gagey C., Wolski J., Barrios M. 2019. Evaluación experimental de la calidad del suelo en respuesta a prácticas de manejo hortícola. La cama de pollo. *Actas de la V Reunión Argentina de Geoquímica de la Superficie Edición - La Plata: Asociación Argentina de Sedimentología*, 2019. Archivo Digital: descarga. ISBN: 978-987-96296-7-3
- Madejón E., Madejón P., Burgos P., Perez de Mora A. y F. Cabrera. 2009. Trace elements, pH and organic matter evolution in contaminated soils under assisted natural remediation: A 4-year field study. *Journal of Hazardous Materials* 162: 931–938
- Margesin R. y F. Schinner (eds). 2005. *Manual for soil analysis - Monitoring and assessing soil bioremediation*. Springer Ed. ISBN-13 978-3-540-25346-4
- Marino D. y A. Ronco. 2005. Cypermethrin and Chlorpyrifos Concentration Levels in Surface Water Bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *B Environ Contam Tox* 75 (4):820–826
- Martens Rainer. 1976. Degradation of [8,9,-14C] endosulfan by soil microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 31(6): 853–858

- Mathava K. y Philip L. 2006. Adsorption and desorption characteristics of hydrophobic pesticide endosulfán in four Indian soils. *Chemosphere* 62 (7): 1064–1077
- Menon P., Gopal M. y R Prasad. 2004. Influence of Two Insecticides, Chlorpyrifos and Quinalphos, on Arginine Ammonification and Mineralizable Nitrogen in Two Tropical Soil Types. *Agric. Food Chem.* 52 (24).
- Menone M.L., Pesce S.F., Díaz M.P., Moreno V.J. y D. A. Wunderlin. 2008. Endosulfan induces oxidative stress and changes on detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*, *Phytochemistry* 69 (5): 1150-1157
- Miglioranza K.S.B., Gonzalez M., Ondarza P.M., Shimabukuro V.M., Isla F.I., Fillmann G., Aizpún J.E. y V.J. Moreno. 2013. Assessment of Argentinean Patagonia pollution: PBDEs, OCPs and PCBs in different matrices from the Río Negro basin. *Sci. Total Environ.* 452–453, 275–285
- Miglioranza K.S.B., Grondona S., GLok Galli M., Diaz E. y A. Mugnolo. 2019. Estudio de plaguicidas organoclorados en la cuenca del arroyo Tapalqué. V Reunión Argentina de Geoquímica de la Superficie, La Plata, junio de 2019. <https://bit.ly/2NIMI9S>
- Mitton, F. M., M. Gonzalez, J. M. Monserrat, and K. S. B. Miglioranza. 2016. Potential use of edible crops in the phytoremediation of endosulfan residues in soil. *Chemosphere* 148:300–306.
- Morillo E. y J. Villaverde. 2017. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. *Science of the Total Environment* 586: 576–597
- Motulsky H.J. y Cristopoulos A. 2003. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. Graphpad Software Inc., San Diego CA.
- Moye A.H. 1981. Analysis of Pesticide Residues (Chemical Analysis). Ed. John Wiley & Sons Inc. ISBN-13: 978-0471054610
- Mugni H., Ronco A. y C. Bonetto. 2011. Insecticide toxicity to *Hyalella curvispina* in runoff and stream water within a soybean farm (Buenos Aires, Argentina). *Ecotoxicol Environ Safety* 74:350–354
- Muir D.C.G, Teixeira C.A., Alae M. y M. Hermanson. 2007. Persistent organohalogenes and current use pesticides in remote lake waters, sediments, and ice caps. In: Castro-Jiménez J, Eisenreich SJ, Vices I. 2007. Persistent 42 Organic Pollutants (POPs) in the European Atmosphere: An Updated Overview. Institute for Environment and Sustainability. European Commission, Directorate-General, Joint Research Centre. EUR 22876 EN. Pp88-95
- Nannipieri P. 1994. The potential use of enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: CE Pankhurst; BM Doube; VVS Gupta & PR Grace (eds). Soil Biota- Management in Sustainable Farming Systems. CSIRO, East Melbourne Australia. p 238-244.
- Negro C.L., Iturburu F.G., Mendieta J., Menone M.L. y P. Collins. 2019. Are Oxidative Stress Biomarkers Sensitive to Environmental Concentrations of Chlorpyrifos Exposed to the Freshwater Crab, *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda; Trichodactylidae)? *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 103(3): 405-410

Nelson D.W. y L.E. Sommers. 1996. Rapid dichromate oxidation techniques, pp. 988-996 del capítulo: Total carbon, organic carbon, and organic matter. En: D.L. Sparks (ed.) Methods of soil analysis, part 3, chemical methods, SSSA book series no. 5, SSSA, Madison, WI, pp. 961-1010.

Newman L.A. y CM. Reynolds. 2004. Phytodegradation of organic compounds. Current Opinion in Biotechnology. 15: 225-230

Niti C., Sunita S., Kamlesh K. y K. Rakesh. 2013. Bioremediation: An emerging technology for remediation of pesticides. Res. J. Chem. Environ 17: 88–105

NRA, National Registration Authority. 1998. Review of Endosulfan, Commonwealth of Australia, accessed at www.nra.gov.au/chemrev/chemrev.html

Nsanganwimana F., Pourrut B., Mench M. y F. Douay. 2014. Suitability of Miscanthus Species for Managing Inorganic and Organic Contaminated Land and Restoring Ecosystem Services. A Review. Journal of Environmental Management 143:123–34.

Nocentini M., Pinelli D. y F. Fava. 2000. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem. Chemosphere 41 (8): 1115-1123

Novontný A., Erbanova P., Sasek V., Kubatova A., CajthamL T., Lang E., KrahJ. y F. Zadrazil. 1999. Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. Biodegradation 10:159-168

Odukkathil G. y N. Vasudevan. 2016. Residues of endosulfan in surface and subsurface agricultural soil and its bioremediation. Journal of Environmental Management 165:72-80

Ortíz I., Velasco A., Le Borgne S. y S. Revah. 2013. Biodegradation of DDT by stimulation of indigenous microbial populations in soil with cosubstrates. Biodegradation 24 (2): 215-225

PAN. 2012. Pesticide Action Network. Clorpirifós: un posible COP a nivel global.

PAN-NA. 2018. Pesticide Action Network-North America. Historic: Hawaii enacts first U.S. ban on chlorpyrifos. <http://www.panna.org/blog/historic-hawai%E2%80%98enacts-first-us-ban-chlorpyrifos>

Park J., Choi I. y Y. Kim. 2015. Cookies formulated from fresh okara using starch, soy flour and hydroxypropyl methylcellulose have high quality and nutritional value. LWT–Food Sci. Technol. 63, 660–666.

Parkpian P., Anurakpongsatorn P., Pakkong P., y W.H. Patrick. 1998. Adsorption, desorption and degradation of α -endosulfan in tropical soils of Thailand. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 33(3): 211–233

Parsek M.R., Mc Fall S.M. y A.M. Chakrabarty. 1995. Microbial degradation of toxic environment pollution: ecological and evolutionary consideration. Int Biodeter Biodegrad 35:175–188

Paterlini H, González M.V. y L.I. Picone. 2017. Calidad de la cama de pollo fresca y compostada. Cienc Suelo (Argentina) 35(1): 69-78.

Paz-Ferreiro J., Trasar-Cepeda C., Leirós M.C., Seoane S., Gil-Sotres F. 2010. Effect of management and climate on biochemical properties of grassland soils from Galicia (NW Spain). *Eur. J. Soil Biol.* 46: 136-143.

Pimmata P., Reungsang A. y P. Plangklang. 2013. Comparative bioremediation of carbofuran contaminated soil by natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85: 196-204

Pivetz BE. 2001. Phytoremediation of Contaminated Soil and Ground Water at Hazardous Sites. Ground Water Issue, EPA/540/S-01/500.

PPDB. 2019. Pesticide Properties Database. Univ. Hertfordshire. Disponible en: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es> (Fecha de acceso: 4/9/19).

Pual V. y E. Balasubramanaim. 1997. Effect of single and repeated administration of endosulfán on behavior and its interaction with centrally acting drugs in experimental animals: A mini review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 3:151-157

Querejeta G.A., Ramos L. M., Hughes E. A., D. Vullo, Zalts A. y J. M. Montserrat. 2014. Environmental Fate of Trifluralin, Procymidone, and Chlorpyrifos in Small Horticultural Production Units in Argentina. *Water Air Soil Pollut* 225:1952

Querejeta G.A. 2015. Efectos de la utilización de productos fitosanitarios sobre el suelo de los sistemas productivos hortícolas. Tesis doctoral tesis en Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de General Sarmiento.

Racke K. D. y J. R. Coats. 1990. Enhanced biodegradation of pesticides in the environment. In *ACS Symposium Series* (No. 426) (pp 53–67). American Chemical Society.

Ramachandra T.V. 2006. Soil and groundwater pollution from agricultural activities. Commonwealth of Learning, Indian Institute of Science

Ramírez-Sandoval M., Melchor-Partida G.N., Muñiz-Hernández S., Girón-Pérez M.I., Rojas-García A.E., Medina-Díaz I.M., Robledo-Marenco M.L. y J.B. Velázquez-Fernández. 2011. Phytoremediatory effect and growth of two species of *Ocimum* in endosulfán polluted soil. *Journal of Hazardous Materials*. 192 (1): 388–392

Ramos L., Berenstein G., Hughes E. A., Zalts A., y J.M. Montserrat. 2015. Polyethylene film incorporation into the horticultural soil of small periurban production units in Argentina. *Sci of Total Environ*, 523, 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.142>

Ramos Agüero D., Alfonso E.T., Carreño F.S., Cabrera Rodríguez A., Martín Alonso G.M. y L. F. Chuaerey. 2016. Respuesta del cultivo del plátano a diferentes proporciones de suelo y bocashi, complementadas con fertilizante mineral en etapa de vivero. *Cultivos Tropicales*. 37 (2): 165-174

Rampoldi E.A., Hang S. y E. Barriuso. 2014. Carbon-14-Glyphosate behavior in relationship to pedoclimatic conditions and crop sequence. *J. Environ. Qual.* 43:558–567

Rao D.M.R. y A. S. Murty. 1980. Persistence of endosulfan in soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(6),1099–1101

Rapaport R.A. y S.J. Eisenreich. 1988. Historical inputs of high molecular weight chlorinated hydrocarbons to eastern North America. *Environmental Science and Technology* 22: 931-941.

Raskin I., Smith R.D. y D.E. Salt. 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 221-226.

Rauh V.A., Garfinkel R., Perera R., Andrews H., Hoepner L., Barr D., Whitehead D., Tang D. y R.M. Whyatt. 2006. Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics* 118:1845-1859

Redondo-Cuenca A., Villanueva-Suárez M.J. y I. Mateos-Aparicio. 2008. Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and englyst method. *Food Chem.* 108, 1099–1108.

Reichenauer T.G. y J.J. Germida. 2008. Phytoremediation of Organic Contaminants in Soil and Groundwater. *ChemSusChem* 1, 708 – 717. DOI: 10.1002/cssc.200800125

Rein A., Adam I., Miltner A., Brumme K., Kästner M. y S. Trapp. 2015. Impact of bacterial activity on turnover of insoluble hydrophobic substrates (phenanthrene and pyrene)—Model simulations for prediction of bioremediation success. *Journal of Hazardous Materials* 306:105–114

Restrepo J. 2010. A, B, C de la agricultura orgánica y panes de piedra: Abonos orgánicos fermentados. 1a ed. Colombia: Feriva S.A. 86 pp. ISBN. 978-958-44-126-1

Riepert F. y B.M. Wilke. 1998. Soil quality. Guidance on the ecotoxicological characterization of soils and soil material. Document ISO/15.799,

Riera N., Della Torre V., Rizzo P.F., Butti M., Bressan F.M., Zarate N., Weigandt C. y D. E.C. Crespo. 2014. Evaluación del proceso de compostaje de dos mezclas de residuos avícolas Rev. FCA UNCUIYO 46(1): 195-203. ISSN impreso 0370-4661. ISSN (en línea) 1853-8665.

Rivero A., S. Niell, L. Pareja, M.P. Cerdeiras, H. Heinzen y V. Cesio. 2012. Capacidad de los basidiomicetes para degradar Endosulfán y Clorpirifós en una matriz compleja. VII Congreso de Medio Ambiente /AUGM. 22-24 mayo.

Robertson B.K. y M. Alexander. 1994. Growth-linked and cometabolic biodegradation: possible reason for occurrence or absence of accelerated pesticide biodegradation. *Pestic. Sci.* 41, 311–318.

Rodríguez-Morgado B., Gómez I., Parrado J., García-Martínez A.M., Aragón C. y M. Tejada. 2015c. Obtaining edaphic biostimulants/biofertilizers from different sewage sludges. Effects on soil biological properties. *Environ. Technol.* 36, 2217-2226.

Romyen S., Luepromchai E., Hawker D. y B. Karnchanasest. 2007. Potential of agricultural by-product in reducing chlorpyrifos leaching through soil. *J. Appl. Sci.* 7, 2686–2690.

Ros M., Hernandez M.T. y C. García. 2003. *Soil Biology and Biochemistry* 35 (3): 463–469

Rossel D., J. Tarradellas G. Bitton y J.L. Morel. 1997. Use of enzymes in soil ecotoxicology: a case for dehydrogenase and hydrolytic enzymes. p. 179–206. En Tarradellas, J., Bitton, G., Rossel, D. (eds.), Soil Ecotoxicology. CRC Press.

Rutherford D.W., Bednar A.J., Garbarino J.R., Needham R., Stave K.W. y R.L. Warshaw. 2003. Environmental fate of roxarsone in poultry litter. Part II. Mobility of arsenic in soils amended with poultry litter. *Environ Sci. Technol.* 37: 1515-1520.

Saer A., Lansing S., Davitt N. y Graves R.E. 2013. Life cycle assessment of a food waste composting system: environmental impact hotspots. *Journal of Cleaner Production* 52: 234–244

Sagarkar S., Mukherjee S., Nousiainen A., Björklöf K., Purohit H., Jørgensen K. y A. Kapley. 2013. Monitoring bioremediation of atrazine in soil microcosms using molecular tools. *Environmental Pollution* (172): 108-115
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.07.048>.

SAGyP-INTA. 1989. Mapa de Suelos de la Provincia de Buenos Aires, escala 1:500.000. 527pp, SAGyP, Bs. As. Argentina.

Salt D.E., Blaylock M., Kumar P., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I y I. Raskin. 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants of outstanding interest. *Bio-Technology* 13: 468–474.

Sanchez-Hernandez J.C., Sandoval M. y A. Pierant. 2017. Short-term response of soil enzyme in a chlorpyrifos-treated mesocosmos: Use of enzyme-based indexes. *Ecol. Indic.* 73, 525-535.

Scelza R., Rao M.A., Gianfreda L. 2008. Response of an agricultural soil to pentachlorophenol (PCP) contamination and the addition of compost or dissolved organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 40. 2162–2169

Secretaría de Comercio Interior. 2012. La Producción de Hortalizas en Argentina. http://www.mercadocentral.gob.ar/ziptecnicas/la_produccion_de_hortalizas_en_argentina.pdf

SENASA. 2011. Resolución 511/2011. <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1501&io=17737>

Shan M., Fang H., Wang X., Feng B., Chu Q. y Y.L. Yu. 2006. Effect of chlorpyrifos on soil microbial populations and enzyme activities. *J. Environ. Sci. China* 18, 4-5.

Siddique T., Okeke B.C., Arshad M. y W.T. Jr. Frankenberger. 2003. Enrichment and isolation of endosulfan-degrading microorganisms. *J Environ Qual.* 2003 Jan-Feb;32(1):47-54.

Sinha N., Narayan R. y D. Saxena. 1997. Effect of Endosulfan on the Testis of Growing Rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58(1):79-86

Singh V. y N. Singh. 2014. Uptake and accumulation of endosulfan isomers and its metabolite endosulfan sulfate in naturally growing plants of contaminated area. *Ecotox. Environ. Safe* 104, 189-193.

Singh V., Lehri A. y N. Singh. 2019. Assessment and comparison of phytoremediation potential of selected plant species against endosulfán. *International Journal of Environmental Science and Technology* 16 (7): 3231-3248

Singh B.K., Walker A., Morgan J.A.W. y J.D. Wright. 2003. Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5198–5206

Singh S., Dureja P. y S. Kumar. 2000. Biodegradation of α and β isomers of endosulphan and endosulphan sulphate in Indian soils, *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 35:3, 337-346

Sitholé B. 2005. New method of measuring the pH of wood chips. *Pulp & Paper Canada*. 106(11):235-238

Sobrero M.C. y A. Ronco. 2004. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. En: Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. G. Castillo (ed.). IDRC, IMTA, Canadá. 202 pp

Somtrakoon K., Kruatrachue M. y Lee H. 2014. Phytoremediation of Endosulfán Sulfate-Contaminated Soil by Single and Mixed Plant Cultivations. *Water Air Soil Pollut* (2014) 225:1886

Souza Casadinho J. 2012. Los conflictos ambientales en las áreas periurbanas bonaerenses: la utilización de agrotóxicos y la propuesta agroecológica. XVI Jornadas Nacionales de Extensión Rural. Argentina

Souza Casadinho J. y S. Bocero. 2008. Agrotóxicos: Condiciones de utilización en la horticultura de la Provincia de Buenos Aires (Argentina), *Revista Iberoamericana de Economía Ecológica*, 9: 87-101

Sparks D., Page A., Helmke P., Loeppert R., Soltanpour P., Tabatabai M., Johnston C. y M. Sumner. 1996. Methods of soil analysis. Part 3-Chemical methods. Fifth edition. Soil Science Society of America, Wisconsin.

Stoorvogel J., Jaramillo R., Merino R. y S. Kosten. 2003. Plaguicidas en el medio ambiente. Capítulo 3 en Los plaguicidas: impactos en producción, salud y medio ambiente en Carchi, Ecuador. Ed. D. Yanggen, C. C. Crissman, P. Espinosa. Ediciones Abya-Yala

Sunderam R.I.M, Cheng D.M.H y G.B Thompson. 1992. Toxicity of Endosulfan to native and introduced fish in Australia. *Environmental Toxicology and chemistry*, 11: 1469-1476

Tabatabai M.A. y J.M. Bremner. 1969. Use of p-nitrophenol phosphate in assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol Biochem.* 1: 301–307

Tabatai M.A. 1982. Soil enzymes. En: Page A.L., Miller E.M., Keeney D.R. (Eds.). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. Soil Science Society of America, Inc, Madison. Pp 903-947

- Tang F.H.M, Jeffries T.C., Vervoort R. W., Conoley C., Coleman N.V. y F. Maggi. 2019. Microcosm experiments and kinetic modeling of glyphosate biodegradation in soils and sediments. *Science of the Total Environment* 658: 105–115
- Tariq M.I., Afzal S. y I. Hussain. 2006. Degradation and persistence of cotton pesticides in sandy loamsoils from Punjab, Pakistan. *Environmental Research* 100: 184–196
- Técher, D., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bennasroune, A., Formánek, P., MartinezChois, C., D’Innocenzo, M., Muanda, F., Dicko, A., Rejsek, K. y J. Falla. 2011. Contribution of *Miscanthus giganteus* root exudates to the biostimulation of PAH degradation: an in vitro study. *Sci. Tot. Environ.* 409, 4489-4495.
- Técher D., D’Innocenzo M.C., Laval-Gilly P., Henry S., Bennasroune A., Martinez Chois, C. y J. Falla. 2012a. Assessment of *Miscanthus giganteus* secondary root metabolites for the biostimulation of PAH-utilizing soil bacteria. *Appl. Soil. Ecol.* 62, 142-146
- Tejada M., García-Martínez A.M., Gómez I. y J. Parrado. 2010. Application of MCPA herbicide on soils amended with biostimulants: Short-time effects on soil biological properties. *Chemosphere* 80. 1088-1094.
- Tejada, M., Benítez, C. y J. Parrado. 2011a. Application of biostimulants in benzo(a)pyrene polluted soils: Short-time effects on soil biochemical properties. *Appl. Soil Ecol.* 50. 21-26.
- Tejada M., Gomez I. y M. Del Toro. 2011b. Use of organic amendments as a biorremediation strategy to reduce the bioavailability of chlorpyrifos insecticide in soils. Effect on soil biology. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 2075-2
- Tejada M., Rodriguez-Morgado B., Gómez I. y J. Parrado. 2014. Degradation of chlorpyrifos using different biostimulants/biofertilizers: Effects on soil biochemical properties and microbial community. *Applied Soil Ecology* 84:158-165
- Thalmann A. 1968. A procedure for the determination of dehydrogenase activity in the soil by means of triphenyltetrazolium chloride (TTC). *Landwirt Forsch.* 249–258
- Thompson I.P., Van der Gast C.J., Ciric L. y A.C. Singer. 2005. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ Microbiol* 7: 909–915
- Tam N.F.Y. y S.M. Tiquia. 1994. Assessing toxicity of spent sawdust pig-litter using seed germination technique. *Resources, Conservation and Recycling*, 11: 261-274
- Tiquia S.M. y N.F.Y. Tam. 2002. Characterization and composting of poultry litter in forced-aeration piles. *Process Biochem.*, 37: 869-880
- Tiwari M.K. y S. Guha. 2012. Role of soil organic matter on the sorption and cosorption of endosulfan and chlorpyrifos on agricultural soils. *J. Environ. Eng. ASCE* 138, 426–435.
- Tiwari M.K. y S. Guha. 2013. Kinetics of the biodegradation pathway of endosulfán in the aerobic and anaerobic environments. *Chemosphere* 93: 567-573.
- Toniutti M.A., Fornasero L., Tenorio D. y J. Mollo. 1999. Evaluación de la biomasa microbiana en el proceso de recuperación de suelos. *Revista FAVE* 13(2): 5-11

Tombesi N., Pozo K. y T. Harner. 2014. Persistent Organic Pollutants (POPs) in the atmosphere of agricultural and urban areas in the Province of Buenos Aires in Argentina using PUF disk passive air samplers. *Atmospheric Pollution Research* 5 (2):170–17

Tyagi M., M.M.R. da Fonseca y C.C.R. Carvalho. 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation* 22:231–241

UNEP/AMAP. 2011. United Nations Environmental Program/Arctic Monitoring and Assessment Program. Climate change and POPs: predicting the impacts Report of the UNEP/AMAP Expert Group, Secretariat of the Stockholm Convention, Geneva, Switzerland (2011), p. 62

US-EPA. 1998. United States Environmental Protection Agency. An Analysis of Composting as an Environmental Remediation Technology.

US EPA. 1999. Use of Monitored Natural Attenuation at Superfund, RCRA Corrective Action, and Underground Storage of Tank Sites. US Environmental Protection. Office of solid waste and emergency response. Pp. 4-17

US EPA. 2002. Reregistration Eligibility Decision for Endosulfan.

USGS. 2015. The NAWQA Pesticide National Synthesis Project. U.S. Geological Survey. Predicting Pesticides in Streams and Rivers: Where is Water Quality at Risk? <http://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/>

Vance E.D., Brookes PC y D.S. Jenkinson. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass. *Soil Biol Biochem* 19:703-707

Van Hamme J. D. 2004. Bioavailability and Biodegradation of Organic Pollutants – A Microbial Perspective *Soil Biology, Volume 2. Biodegradation and Bioremediation*. Eds. A. Singh y O. P. Ward. Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Verma J.P., Jaiswal D. K. y R. Sagar. 2014. Pesticide relevance and their microbial degradation: A-state-of-art. *Rev Environ Sci Biotechnol* (2014) 13:429–466

Vidali M. 2001. Bioremediation An overview, *Pure Appl.Chem.* Vol. 73, No. 7, pp1163–1172

Villanueva-Suárez M.J., Pérez-Cózar M.L., Redondo-Cuenca A. 2013. Sequential extraction of polysaccharides from enzymatically hydrolyzed okara byproduct: physicochemical properties and in vitro fermentability. *Food Chem.* 141, 1114–1119.

Villegas L.B., Martínez M.A., Rodríguez A. y M.J. Amoroso. 2014. Chapter 8 Microbial Consortia, a Viable Alternative for Cleanup of Contaminated Soils. En A. Alvarez y M.A. Polti (eds.). *Bioremediation in Latin America: Current Research and Perspectives*, DOI 10.1007/978-3-319-05738-5_8

Voběrková S., Vavěrková M. D., Burešová A., Adamcová D., Vršanská M., Kynický J., Brtnický M. y V. Adam. 2017. Effect of inoculation with white-rot fungi and fungal consortium on the composting efficiency of municipal solid waste. *Waste Management* 61:157–164.

Walker D.J., Clemente R. y M.P. Bernal. 2004. Contrasting effects of manure and compost on soil pH, heavy metal availability and growth of *Chenopodium album* L. In a soil contaminated by pyritic mine waste. *Chemosphere* 57: 215-224

Walker A. y S.J. Welch. 1991. Enhanced degradation of some soil-applied herbicides. *Weed Research*, 31(1), 49–57.

Walkley A. 1947. A Critical Examination of a Rapid Method for Determination of Organic Carbon in Soils - Effect of Variations in Digestion Conditions and of Inorganic Soil Constituents. *Soil Sci.* 63:251-257.

Wanat N., Austruy, A., Joussein, E., Soubrand, M., Hitmi, A., Gauthier-Moussard, C., Lenain, J.-F., Vernay, P., Munch, J.C. y M. Pichon. 2013. Potentials of *Miscanthus giganteus* grown on highly contaminated technosols. *J. Geochem. Explor* 126-127, 78-84.

Wang F., Jiang X., Bian Y., Yao F., Gao H., Yu G., Jean C.M. y S. Reiner. 2007. Organochlorine pesticides in soils under different land usage in the Taihu Lake region, China. *J. Environ. Sci.*, 19 (2007), pp. 584–590.

Wang P., Rashid M., Liu J., Hu M. y G. Zhang. 2016. Identification of multiinsecticide residues using GC-NPD and the degradation kinetics of chlorpyrifos in sweet corn and soils. *Food Chem.* 212, 420-426

Weber J., C. J. Halsall, D. Muir, C. Teixeira, J. Small y K. Solomon. 2010. Endosulfan, a global pesticide: a review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Sci. Total Environ.* 408:2966–2984.

WHO. 2009. The World Health Organization recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009. ISBN 978 92 4 154796 3. http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/pesticides/es/

Williams W.M., Giddings J.M., Purdy J., Solomon K.R. y J.P. Giesy. 2014. Exposures of aquatic organisms to the organophosphorus insecticide, chlorpyrifos resulting from use in the United States. *Rev Environ Contam Toxicol* 231:77–118

Wolińska A. y Z. Stępniewska. 2012. Dehydrogenase Activity in the Soil Environment. Capítulo 8 de Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. Dehydrogenases, book edited by Rosa Angela Canuto, ISBN 978-953-307-019-3. <https://www.intechopen.com/books/dehydrogenases/dehydrogenase-activity-in-the-soil-environment>

Xie W. T. y S.G. Wang. 2011. A short-term study on the interaction of bacteria, fungi and endosulfán in soil microcosm. *Science of the total environment* 412-413: 375-379.

Xu F., Liu L., Wei W. y R. Xu. 2017. Determination of five endosulfan pesticides in the fish pond water by dispersive liquid-liquid microextraction combined with GC-MS. *Forensic sciences research* 2(1), 40–45

Young J., Rizzo P., Riera N., Della Torre V., López V., Molina C., Fernández F., Crespo D., Barrena R., Komilis D. y A. Sánchez. 2016. Development of phytotoxicity indexes and

their correlation with ecotoxicological stability and physicochemical parameters during passive composting of poultry manure. *Waste Management* 54 (2016) 101–109

Zeng G.M., Yu, Z., Chen, Y.N., Zhang, J.C., Li, H. y M. Yu. 2011b. Response of compost maturity and microbial community composition to pentachlorophenol (PCP)-contaminated soil during composting. *Bioresour. Technol* 102, 5905-5911

Zhang J., Qin J., Zhao C., Liu C., Xie H. y S. Liang. 2015. Response of Bacteria and Fungi in Soil Microcosm under the Presence of Pesticide Endosulfán. *Water Air Soil Pollut* 226: 109

Zucconi F., Pera A., Forte M. y M. de Bertoldi. 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle*, 2(2): 54-57

Material Suplementario

A) Puesta a punto del procedimiento de extracción de clorpirifos y endosulfán de suelo

Metodología

Se compararon 5 variantes de una metodología de extracción comparando la relación *suelo:solvente*, el método de agitación y la presencia/ausencia de un agente desecante. Para esto se utilizaron 50 g de suelo tamizado y se les aplicó endosulfán (p.a.) en solución acuosa de modo de llegar al 60% de la capacidad de campo del suelo y a una concentración de 4,4 mg/kg suelo seco. Luego de una hora, se procedió con las extracciones utilizando como solvente de extracción una mezcla de acetona: ciclohexano en relación 1:1. Se trabajó por duplicado y los tratamientos fueron los siguientes:

-SS: se utilizó una relación *suelo:solvente* 1:2 (m/V), es decir 50 g de suelo con 100 mL de solvente. Además se agregó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) como agente desecante en proporción 1:1 *suelo:sulfato de sodio*. La mezcla se agita mediante ultrasonificación durante 20 minutos.

-SS+A: mismo tratamiento que SS agregando posteriormente agitación mecánica orbital a 280 rpm durante 10 minutos.

-TOTAL: se utilizó una relación *suelo:solvente* 1:5 (m/V). La mezcla se agita mediante ultrasonificación durante 20 minutos. Sin agregado de sulfato de sodio a la mezcla.

-SON: se utilizó una relación *suelo:solvente* 1:2 (m/V). La mezcla se agita mediante ultrasonificación durante 20 minutos. Sin agregado de sulfato de sodio a la mezcla.

-AGI: se utilizó una relación *suelo:solvente* 1:2 (m/V). La mezcla se agita mecánicamente (en orbital) a 280 rpm durante 20 minutos y luego mediante ultrasonificación durante 20 minutos. Sin agregado de sulfato de sodio a la mezcla.

Para el tratamiento TOTAL al tratarse de un volumen mayor se tomaron dos alícuotas de cada réplica para una mayor representatividad. Todas las suspensiones se filtraron en columnas empaquetadas con 1 gramo de sílica gel 60 (0,015-0,040 mm) CAS No. 7631-86-9, Merck® y 0,5 gramos de sulfato de sodio en la parte superior y se conservaron a -18°C hasta su análisis como se describe en el Capítulo 2 inciso 2.2.3.3.

Resultados

Entre las metodologías de extracción, las que incluyeron la agitación mecánica fueron las que mayor porcentaje de recuperación relativa tuvieron (Fig.1). El tratamiento con 30 minutos seguido de ultrasonificación es significativamente mejor que el resto. Llevar la relación *suelo:solvente* a 1:5 no afectó la extracción del plaguicida, así como tampoco lo hizo el agente desecante.

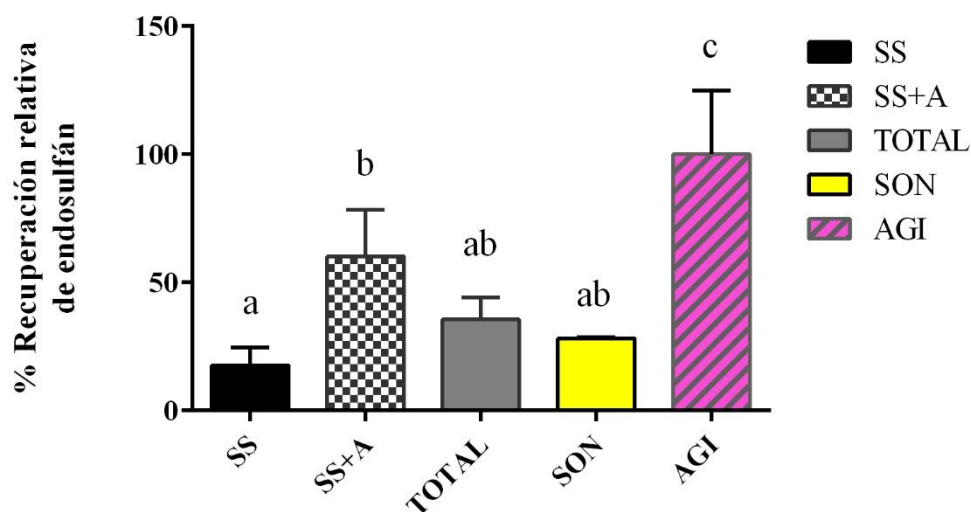


Fig a.1. Resultados de extracciones comparativas. El porcentaje de recuperación relativa se calculó en base al área media de los picos en cada cromatograma. Aquellos tratamientos con una letra en común no son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$)

Respecto a los objetivos particulares se logró optimizar una metodología de extracción que permite usar una baja relación suelo:solvente y suelo:agente desecante con la consecuente reducción de costos y residuos. Estas mismas condiciones de extracción se aplicaron para la extracción conjunta de endosulfán y clorpirifos.

B) Curvas de calibrado del ensayo atenuación natural.

Para cuantificar los plaguicidas en suelo, se realizaron curvas de calibrado por GC-ECD para clorpirifos, endosulfán y endosulfán sulfato, adicionando al suelo de referencia (SR) una solución madre a 5 distintas concentraciones, por triplicado. La solución madre fue preparada a partir de los productos puros (principio activo). La extracción fue realizada con ciclohexano: acetona tal como fue descrito en la sección 2.2.3.1. Las figuras b.2 y b.3 muestran los gráficos resultantes, con las pendientes y el coeficiente de regresión obtenido.

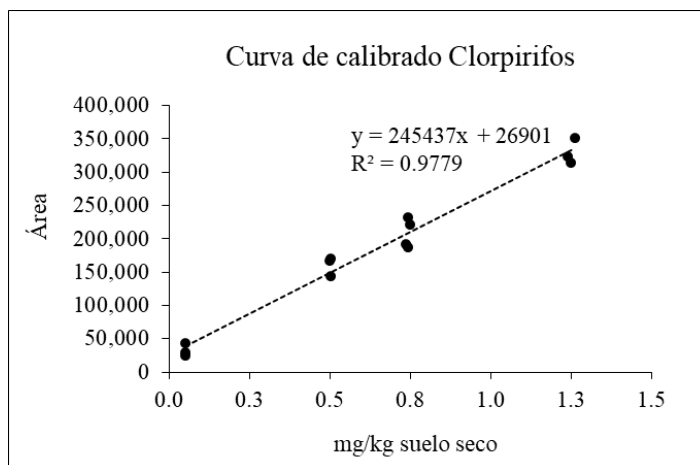


Fig. b.2. Curva de calibrado de clorpirifos

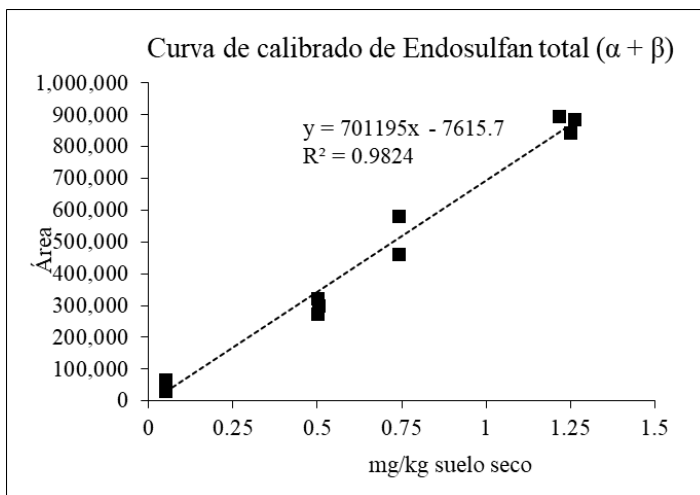


Fig. b.3. Curva de calibrado de endosulfán total en suelo

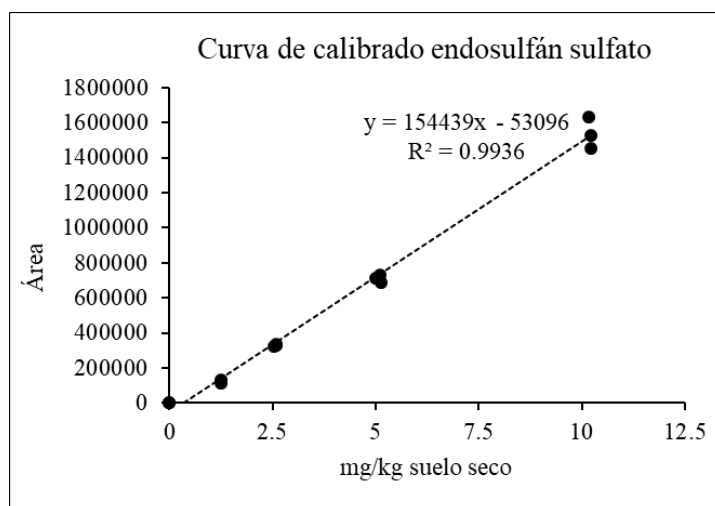


Fig. b.4. Curva de calibrado de endosulfán sulfato en suelo

C) Curva de calibrado para la Actividad Enzimática Deshidrogenasa

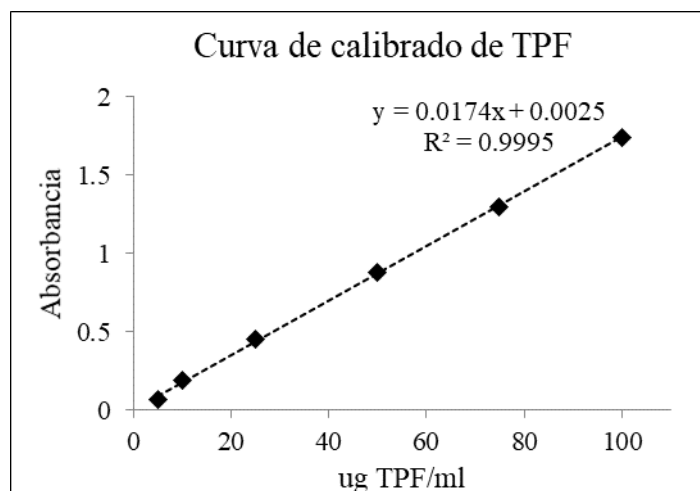


Fig. c.4. Curva de calibrado de TPF (trifenilformazán)

D) Medio mineral para aislamiento

Se preparó de la siguiente manera:

Solución A, en 100 mL de agua destilada se disolvieron

| | |
|--|-------|
| Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) | 0,85g |
| Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) | 2,16g |
| Fosfato de sodio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) | 5g |
| Cloruro de amonio (NH_4Cl) | 0,05g |

Solución B, en 50 mL de agua destilada se disolvió

| | |
|---|-------|
| Cloruro de Calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 1,82g |
|---|-------|

Solución C, en 50 mL de agua destilada se disolvió

| | |
|--|--------|
| Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 1,125g |
|--|--------|

Solución D, en 50 mL de agua destilada se disolvió

| | |
|---|--------|
| Cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) | 0,012g |
|---|--------|

En 200 mL de agua se agregan 5 mL de la solución A, 0,5 mL de la Sol B, 0,5 mL de la Sol C y 0,5 mL de la Sol D. Se llevan a 500 mL con agua destilada en matraz aforado y se mantuvo refrigerado.

E) Soluciones para placa de agar

Luria Bertani (LB)

Triptona 10g/L

Cloruro de Sodio 10g/L

Extracto de levadura 5g/L

Ágar 15g/L

Potato Dextrose Agar (PDA)

Formula comercial (Bioxon TM) 39g/L

Ambas se disuelven en agua destilada caliente y luego se esteriliza en autoclave a 120 °C durante 15 min.

F) Curva de calibrado para la cuantificación del ensayo en medio líquido

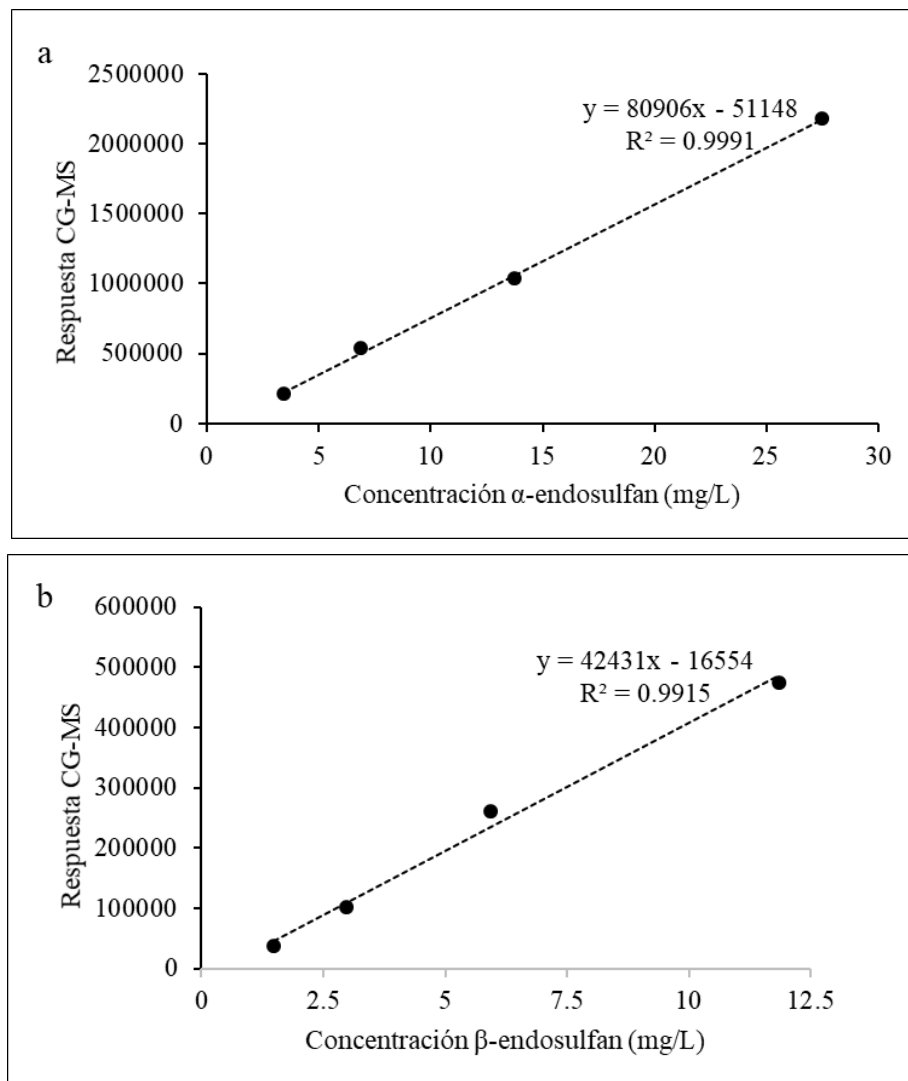


Fig. f.5. Curvas de calibrado en medio líquido a) α -endosulfán b) β -endosulfán. Cada punto representa la media (n=2)

G) Curva de calibrado de endosulfán (suma de isómeros) en suelo y en bioestimulante

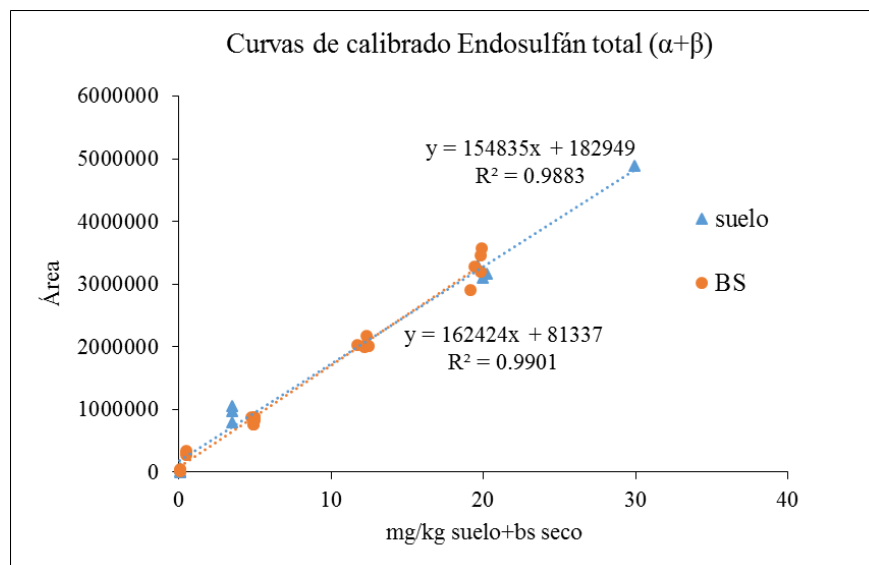


Fig. g.6: Curva de Calibrado de endosulfán en suelo y en suelo+BS en proporción 50:50

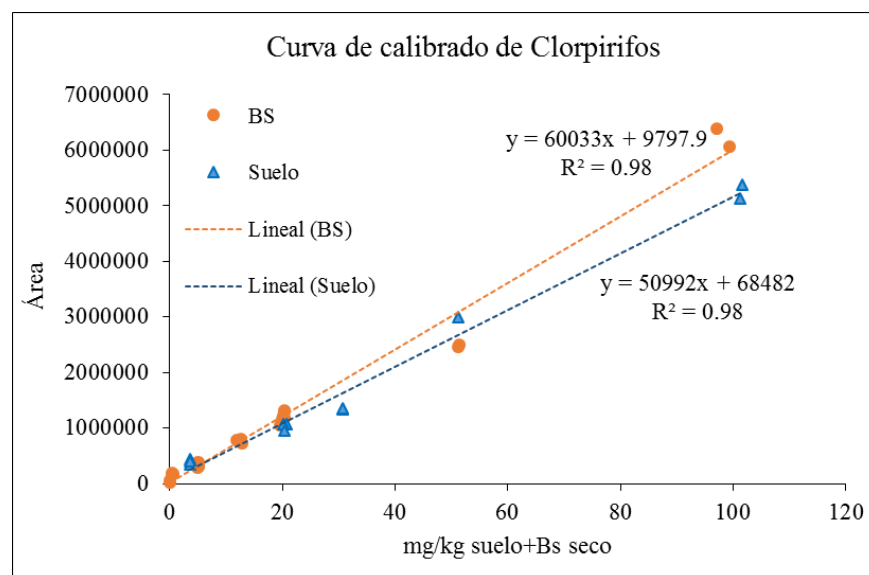


Fig. g.7: Curva de clorpirifos en suelo y en suelo + BS (50:50). El porcentaje de recuperación del clorpirifos en suelo+BS fue del 117% respecto al suelo solo.

H) Preparación de reactivos para actividades enzimáticas

- Buffer borato pH= 10

56,85 g de tetraborato disódico (10 H₂O) o 30 g de tetraborato disódico anhidro en 1500 mL de agua templada. Enfriar y ajustar el pH a 10 con NaOH 20% y llevar a 2 L con agua destilada.

- Buffer Universal Modificado (MUB)

Disolver 6,1 g de trishidroximetilaminometano (THAM); 5,8 g de ácido maleico; 7 g de ácido cítrico y 3,14 g de ácido bórico en 100 mL de agua miliQ. Añadir 244 mL de NaOH 1 M y enrasar a 500 mL con agua miliQ. Almacenar a 4 °C durante 6 semanas como máximo.

- Buffer Universal Modificado (MUB) pH= 11

Verter 200 mL de MUB en un vaso de precipitados de 500 mL. Llevar la solución a pH=11 con NaOH 0,1 M, agitando con agitador magnético. Trasvasar la disolución a un matraz de 1 L, enrasar con agua destilada y almacenar a 4 °C.

- Buffer Universal Modificado (MUB) pH= 6

Mezclar 200 mL de MUB con 500 mL de HCl 0,1 M y enrasar a 1 L con agua destilada. Almacenar a 4 °C durante 3 semanas como máximo.

- THAM- NaOH 0,1 M pH= 12

Disolver 12,2 g de trishidroximetilaminometano en 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH con NaOH 0,5 M hasta pH=12 (aprox. 100 mL) y enrasar con agua destilada

- *p*-Nitrofenol- β -D-glucopiranosido 25 mM

Pesar 0,188 g de *p*-nitrofenol- β -D-glucopiranosido y disolver en 25 mL de buffer MUB HCl pH=6 y enrasar a 25 con mL con el mismo buffer.

I) Curva de calibrado del ensayo de fitorremediación

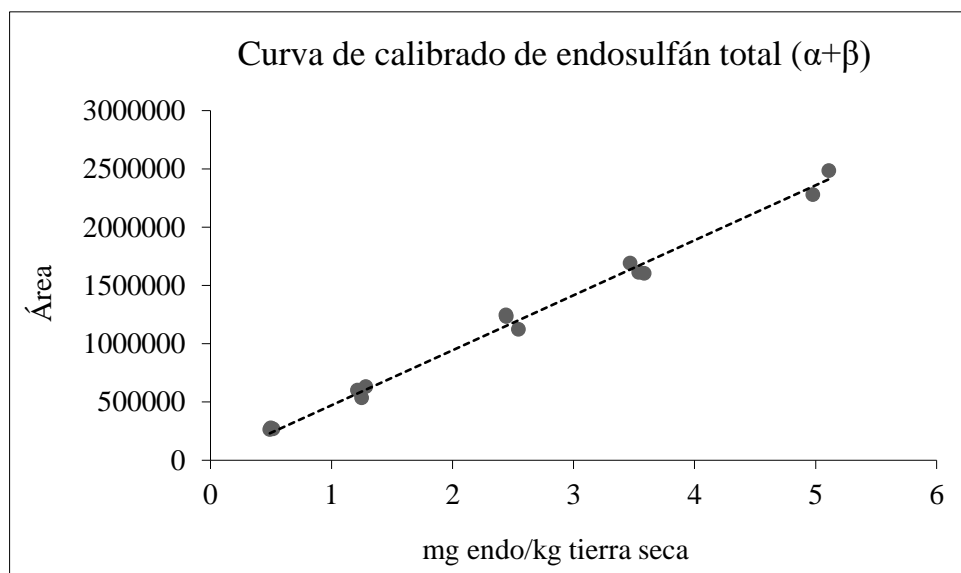


Fig. i.8: curva de calibrado de endosulfán en suelo.

J) Parámetros de validación

j.1) Rango de respuesta lineal

El endosulfán saturó a concentraciones menores que el clorpirifos. Sus rangos fueron: 0,01-100 mg clorpirifos/kg suelo seco, 0,01-100 mg clorpirifos/kg suelo+BS seco; 0,05-30 mg endosulfán/ kg suelo seco y 0,05- 20 mg endosulfán/kg suelo+BS seco.

j.2) Recuperación

En este caso el cálculo se realizó comparando las pendientes de las curvas de calibrado en la matriz suelo y en ciclohexano con plaguicidas; siguiendo la siguiente ecuación:

$$\% \text{ recuperación} = (\text{pendiente en suelo} / \text{pendiente en ciclohexano}) \times 100 = 118,34\%$$

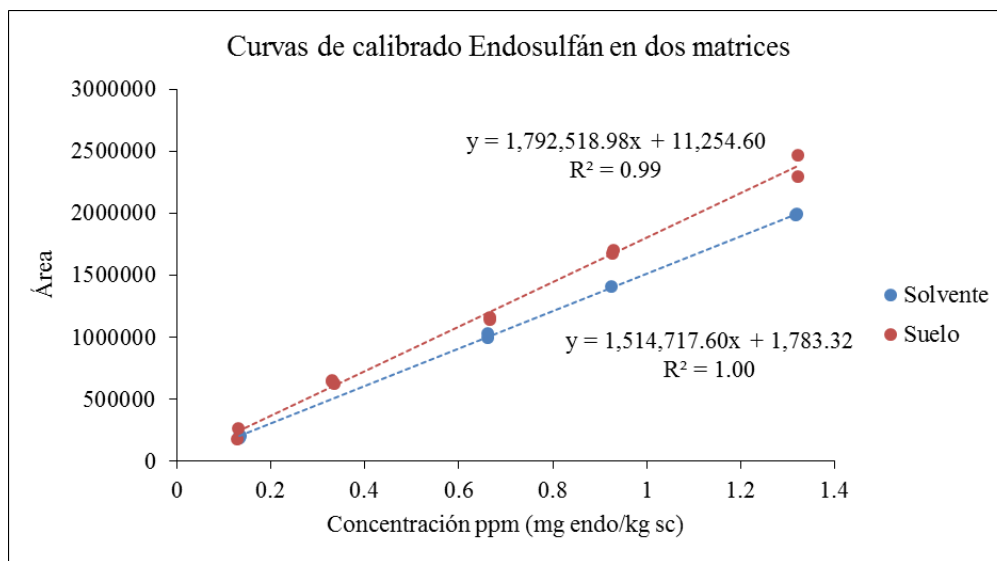


Fig.j.9: Curvas de calibrado en suelo y en solvente (ciclohexano acetona en relación 1:1)

El mayor valor de pendiente observado para la matriz suelo puede explicarse por el efecto protector de inespecíficos extraídos del suelo durante el proceso de volatilización en el inyector.

El porcentaje de recuperación para clorpirifos fue de 101,4% , dato experimental de Querejeta (2015) que fue realizado en el mismo equipo con los mismos reactivos y en un suelo de similares características.

j.3) Precisión

La precisión intermedia fue calculada a partir de la inyección de una muestra que contenía una concentración de 0,06 ppm de clorpirifos. Este procedimiento se realizó en tres días diferentes donde se hicieron diez inyecciones seguidas en cada día. La precisión intermedia se calculó con la desviación estándar de las áreas obtenidas y expresada como porcentaje. De esta forma, el resultado obtenido fue el siguiente:

Clorpirifos (0,06 ppm) precisión 5,9%

La desviación de los valores con respecto a la media fue menor al 10%.

j.4) Resolución

Las condiciones cromatográficas fueron optimizadas de forma tal de poder separar clorpirifos y los isómeros de endosulfán.

j.5) Límite de cuantificación (LC)

Para calcular el LC se utilizó como criterio utilizar el valor del área de la señal de los blancos (a los tiempos de retención específicos) multiplicada por tres y transformada linealmente con los datos de la curva. Se obtuvieron los siguientes valores:

Clorpirifos:

| | Área x 3 | LOD mg/kg sc | LOD medio |
|----|----------|-----------------|-----------|
| Ba | 23085 | 0,019 | 0,025 |
| Bb | 27897 | 0,026 | |
| Bc | 30972 | 0,029 | |

Endosulfán total:

| Blanco | Área x 3 | LOD mg/kg sc | LOD medio |
|--------|----------|-----------------|--------------|
| Ba | 27249 | 0,015 | 0,019 |
| Bb | 33804 | 0,019 | |
| Bc | 43089 | 0,024 | |

En todos los casos los LC resultaron inferiores al primer punto de las correspondientes curvas de calibración.